

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Fyziologie živočichů

Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Simona Hájková**

Změny funkce tukové tkáně během postnatálního vývoje a charakterizace vlivu diety s  
vysokým obsahem tuku na tukovou a jaterní tkáň

Adipose tissue functional changes during postnatal development and impact of high-fat  
diet feeding on adipose and liver tissue

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Kristina Bardová, Ph.D.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Mgr. Kristiny Bardové, Ph.D. ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 2.5.2017

.....  
Simona Hájková

Děkuji své školitelce Mgr. Kristině Bardové, Ph.D. za odborné vedení, obětavost a především čas, který mi věnovala. Také děkuji Mgr. Michaele Svobodové, Ph.D. a Daniele Šálkové za jejich pomoc a rady. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Martinovi Rossmeislovi, Ph.D., MUDr. Janu Kopeckému, DrSc. a všem ostatním členům z Oddělení biologie tukové tkáně FgÚ AV ČR za podnětné připomínky a přátelské prostředí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé své rodině a manželovi za podporu a toleranci.

## Abstrakt

Dlouhodobě zvýšený kalorický příjem může indukovat rozvoj obezity, která v těle vyvolává tzv. mírný systémový zánět. Odpovědí organismu na zánětlivou reakci je aktivace a produkce buněčných komponent imunitního systému, jako jsou např. makrofágy či prozánětlivé cytokiny. Sama tuková tkáň se podílí na produkci bioaktivních látek, včetně leptinu a adiponetinu. Zvýšená koncentrace prozánětlivých cytokinů může vést k dysfunkci důležitých metabolických drah a narušovat tím funkce některých orgánů. Za účelem bližšího poznání etiologie obezity a jejích metabolických komplikací, se nejčastěji používají inbrední kmeny myši s různým genetickým pozadím.

Na myších modelech C57BL/6J a A/J s odlišným sklonem k dietou indukované obezitě jsme pozorovali vliv diety s vysokým obsahem tuku (HFD), konkrétně pak její dopad na tukovou a jaterní tkáň. U myši v časném postnatálním období jsme se zaměřili na popis morfologických a funkčních změn v tukové tkáni a na vyhodnocení plazmatických hladin leptinu a adiponektinu. Dalším cílem bylo změřit míru exprese mRNA leptinu ve čtyřech tkáních.

Výsledky studie ukazují, že zvýšený kalorický příjem vede u myši ke zvýšenému ukládání triacylglycerolů (TAG) do jater a k vyšší zánětlivé reakci v tukové tkáni. U mláďat v postnatálním vývoji jsme zaznamenali výskyt UCP1 pozitivních buněk v bílých tukových depech, jejichž význam pravděpodobně spočívá v přizpůsobení organismu teplotním a nutričním změnám. U mláďat mezi 2. a 4. týdnem došlo k výraznému poklesu v hladinách leptinu, což nasvědčuje tomu, že leptin v rané fázi postnatálního období může sehrávat i úlohu možného regulátoru vývoje.

Závěrem lze shrnout, že předložená studie potvrzuje negativní dopad HFD na tukovou a jaterní tkáň, demonstrováný infiltrací prozánětlivých makrofágů do tukové tkáně a zvýšeným ektopickým ukládáním TAG do jater. Během časného postnatálního vývoje je v bílých tukových depech pozorován výskyt buněk exprimujících UCP1.

**Klíčová slova:** obezita, zánět, leptin, adiponektin, tuková tkáň, jaterní tkáň

## **Abstract**

Caloric intake increased over a long period of time may induce the development of obesity, causing so-called low-grade inflammation. The organism responds to the inflammation by the activation and production of cellular components of the immune system, such as macrophages or proinflammatory cytokines. The adipose tissue itself is involved in the production of bioactive molecules, including leptin and adiponectin. Increased concentration of proinflammatory cytokines can lead to a dysfunction of important metabolic pathways and impair organ's function. For the purpose of closer knowledge of the etiology of obesity and its metabolic complications, inbred strains of mice with different genetic background are most commonly used.

We aimed to define the impact of high-fat diet (HFD) on adipose and liver tissue of C57BL/6J and A/J murine strains with a different susceptibility to diet-induced obesity. We focused on description of morphological and functional changes of adipose tissue and on the evaluation of plasma leptin and adiponectin levels of mice in the early postnatal development. Next, we measured the expression of leptin mRNA in four tissues.

In this study we described how the increased caloric intake leads to increased triacylglycerides (TAG) storage in the liver and to a higher inflammatory response in the adipose tissue. The appearance of UCP1 positive cells in white adipose depots of pups may be linked to an adaptation of an organism to thermal and nutritional challenges during the early postnatal development. The pronounced decrease of plasma leptin levels between 2. and 4. week suggests that leptin may also play a role of possible regulator in the early stage of the postnatal development.

To conclude, this study confirms the negative effect of HFD on adipose and liver tissue, demonstrated by infiltration of proinflammatory macrophages into the adipose tissue and increased ectopic accumulation of TAG in the liver. UCP1 producing cells were detected in white adipose depots during the early postnatal development.

**Key words:** obesity, inflammation, leptin, adiponectin, adipose tissue, liver tissue

# Obsah

<b>Seznam zkratek .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Úvod.....</b>	<b>11</b>
<b>2. Literární přehled .....</b>	<b>12</b>
2.1. Tuková tkáň .....	12
2.1.1. Bílá tuková tkáň .....	14
2.1.2. Hnědá tuková tkáň.....	16
2.1.3. Hnědnutí bílé tukové tkáně .....	18
2.2. Vývoj a původ adipocytů .....	19
2.3. Vaskularizace.....	22
2.4. Adipokiny .....	24
2.4.1. Adiponektin .....	24
2.4.2. Rezistin.....	25
2.4.3. Leptin .....	26
2.5. Metabolizmus lipidů.....	29
2.5.1. Transport lipidů .....	29
2.5.2. Lipogeneze .....	30
2.5.3. Lipolýza .....	32
<b>3. Cíle práce .....</b>	<b>35</b>
<b>4. Experimentální část.....</b>	<b>36</b>
4.1. Pokusná zvířata .....	36
4.2. Přehled pokusů .....	36
4.2.1. Pokus č. 1 .....	36
4.2.2. Pokus č. 2 .....	37
4.3. Histologie .....	37
4.3.1. Barvení hematoxylinem a eosinem .....	38
4.3.2. Barvení kryořezů jaterní tkáně olejovou červení.....	38
4.3.3. Imunohistochemická barvení .....	39
4.4. Stanovení koncentrace triacylglycerolů ve vzorcích jaterní tkáně.....	43
4.5. Izolace RNA .....	44
4.6. Nativní elektroforéza na agarovém gelu.....	46
4.7. Reverzní transkripce.....	47
4.8. Kvantitativní PCR (qPCR) .....	48

4.9.	Statistické vyhodnocení dat .....	50
<b>5.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>52</b>
5.1.	Porovnání vlivu HFD na jaterní a tukovou tkáň u kmenů C57BL/6J a A/J .....	52
5.1.1.	Stanovení koncentrace TAG v játrech.....	53
5.1.2.	Určení míry zánětu tukové tkáně .....	56
5.1.3.	Stanovení koncentrace adiponektinu a leptinu v plazmě .....	57
5.2.	Porovnání morfologických a funkčních změn v tukové tkáni u myší kmene C57BL/6J a A/J v postnatálním období .....	58
5.2.1.	Barvení hematoxylinem a eosinem a imunohistochemické barvení UCP1 .....	60
5.2.2.	Stanovení koncentrace leptinu a adiponektinu v plazmě .....	62
5.2.3.	Stanovení exprese mRNA leptinu .....	63
<b>6.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>66</b>
<b>7.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>72</b>
<b>8.</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>73</b>

## Seznam zkratek

$\beta$ -AR	$\beta$ -adrenergní receptor ( $\beta$ -adrenergic receptor)
$\beta$ -ox	$\beta$ -oxidace ( $\beta$ -oxidation)
ACP	protein přenášející acyly (acyl carrier protein)
AGPAT	acylglycerol-fosfát acyltransferáza (acylglycerol-phosphate acyltransferase)
AMPK	AMP aktivovaná protein kináza (AMP-activated protein kinase)
ATGL	triacylglycerolová lipáza (adipose triglyceride lipase)
BAT	hnědá tuková tkáň (brown adipose tissue)
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
C/EBP	zesilovací protein vázající CCAAT (CCAAT/enhancer binding protein)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát (cyclic adenosine monophosphate)
CLS	struktury připomínající korunu (crown-like structures)
COX-2	cyklooxygenáza-2 (cyclooxygenase 2)
DAG	diacylglyceroly (diacylglycerides)
DH	dorzální roh míšni (dorsal horn)
DL	dorzolumbální tukové depo (dorsolumbar white adipose tissue)
G-3-P	glycerol-3-fosfát (glycerol-3-phosphate)
GLUT4	glukózový přenašeč typu 4 (glucose transporter type 4)
GON	gonadální tukové depo (gonadal white adipose tissue)
GPAT	glycerol-fosfát acyltransferáza (glycerol-phosphate acyltransferase)
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (high-density lipoprotein)
HGF	hepatocytární růstový faktor (hepatocyte growth factor)
Hprt	hypoxantin-guanin fosforibosyl transferáza (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)
HSL	hormon senzitivní lipáza (hormone-sensitive lipase)
iBAT	interskapulární hnědá tuková tkáň (interscapular brown adipose tissue)
IDL	lipoproteiny o střední hustotě (intermediate density lipoprotein)
IKK $\beta$	kináza inhibitoru $\kappa$ B (inhibitor of $\kappa$ B kinase)
IL-1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ )
IL-6	interleukin 6 (interleukin-6)
imWAT	intermuskulární bílá tuková tkáň (intermuscular white adipose tissue)
ingWAT	inguinální bílá tuková tkáň (inguinal white adipose tissue)
IR	inzulínová rezistence (insulin resistance)
I $\kappa$ B $\alpha$	inhibitor $\kappa$ B $\alpha$ (inhibitor kappa B- $\alpha$ )



JNK	c-Jun-N-terminální kináza (c-Jun N-terminal kinase)
KC	Krebsův cyklus (Krebs cycle)
LBA	laterální parabrachiální jádra (lateral parabrachial nucleus)
LDL	lipoproteiny i nízké hustotě (low-density lipoprotein)
LHA	laterální jádra hypotalamu (lateral hypothalamic area)
LPA	lysofosfatidová kyselina (lysophosphatidic acid)
LPL	lipoprotein lipáza (lipoprotein lipase)
LRb	leptinový receptor (leptin receptor)
M1	makrofág typu 1 (macrophage type 1)
MAG	monoacylglyceroly (monoacylglycerides)
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza (mitogen-activated protein kinase)
MCP-1	monocytární chemoatraktivní protein 1 (monocyte chemotactic protein 1)
MGL	monoacylglycerolová lipáza (monoacylglycerol lipase)
MK	mastná kyselina
Myf5	myogenní faktor (myogenic factor)
NA	noradrenalin
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaná forma (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B)
omega 3 PUFA	omega 3 polynenasycené mastné kyseliny (omega 3 polyunsaturated fatty acids)
PA	fosfatidová kyselina (phosphatidic acid)
PGC-1 $\alpha$	koaktivátor receptoru aktivovaného proliferátorem peroxisomů $\gamma$ 1 $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$ )
pgWAT	perigonadální bílá tuková tkáň (perigonadal white adipose tissue)
PKA	protein kináza A (protein kinase A)
POA	preoptická oblast (preoptic area)
POMC	proopiomelanokortin (proopiomelanocortin)
PPARs	receptory aktivované peroxizómovými proliferátory (peroxisome proliferator-activating receptors)
PRDM16	PR doménu obsahující 16 (PR domain containing 16)
RN	raphe nuclei
rWAT	retroperitoneální bílá tuková tkáň (retroperitoneal white adipose tissue)
sBAT	subskapulární hnědá tuková tkáň (subscapular brown adipose tissue)
SG	ganglion stellatum

SOCS3	supresor cytokinové signalizace 3 (suppressor of cytokine signalling 3)
SREBP-1c	protein vázající regulační element sterolu 1 c (sterol regulatory element binding protein 1 c)
STAT3	signální transduktor a aktivátor transkripce 3 (signal transducer and activator of transcription 3)
SVF	stroma vaskulární frakce (stromal vascular fraction)
TAG	triacylglyceroly (triacylglycerides)
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )
TZD	thiazolidindiony (thiazolidinediones)
UCP1	odpřahující protein 1 (uncoupling protein 1)
VEGF-A	vaskulární endoteliální růstový faktor A (vascular endothelial growth factor A)
VH	ventrální roh míšní (ventral horn)
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě (very low-density lipoprotein)
WAT	bílá tuková tkáň (white adipose tissue)

## 1. Úvod

Tuková tkáň je orgán, který je schopen růstu během celého života. Jeho expanze je nejčastěji podmíněna kombinací genetických faktorů a současného způsobu života, který zahrnuje nevhodné stravovací návyky a sníženou pohybovou aktivitu. Dávno již není obezita problémem jen starších lidí, ale stále častěji se s ní můžeme setkávat už u dětí a její prevalence i nadále strmě stoupá. Rozvoj obezity je v těle doprovázen řadou vedlejších metabolických komplikací jako je hypertenze, ateroskleróza, inzulinová rezistence či diabetes mellitus typu 2, které bývají souhrnně označovány termínem metabolický syndrom.

S nadměrným kalorickým příjmem souvisí ektopické ukládání tuků do orgánů, jako jsou játra nebo svaly, a narušení metabolických procesů, za které jsou tyto orgány zodpovědné. Růst tukové tkáně navíc vyvolává tzv. mírný systémový zánět, na který tělo odpovídá zvýšenou infiltrací klasicky aktivovaných M1 makrofágů do tukové tkáně a produkcí cytokinů, jako je např. TNF- $\alpha$  nebo IL-1 $\beta$ , které mohou negativně ovlivňovat klíčové metabolické dráhy. Tuková tkáň vylučuje také řadu bioaktivních látek, tzv. adipokinů, mezi něž řadíme i adiponektin a leptin. Adiponektin má řadu protektivních funkcí podílejících se na redukci obsahu tuků ve svalech nebo na snížení rizika rozvoje kardiovaskulárních chorob a leptin v těle reguluje energetickou rovnováhu.

V diplomové práci, ve které navazuji a rozšiřuji problematiku své bakalářské práce, jsme se snažili zjistit a popsat k jakým změnám dochází v tukové a jaterní tkáni po navození obezity podáváním diety s vysokým obsahem tuku. Pro tyto účely byly použity myši kmene C57BL/6J a A/J, které se liší sklonem k dietou indukované obezitě. Dále jsme se pokusili vyhodnotit vývoj hladin adiponektinu a leptinu v plazmě u myší v postnatálním období a popsat změny v těchto koncentracích po indukci obezity u dospělých jedinců. Součástí této práce bylo změřit expresi leptinu u myší v postnatálním období v různých tkáních.

Diplomová práce se věnuje tématu rozvoje obezity a jejího patofyziologického působení a vývoji tukové tkáně v raném postnatálním období. Objasnění a pochopení funkce tukové tkáně je klíčové pro strategii farmakologické léčby obezity a jejích metabolických komplikací.

## 2. Literární přehled

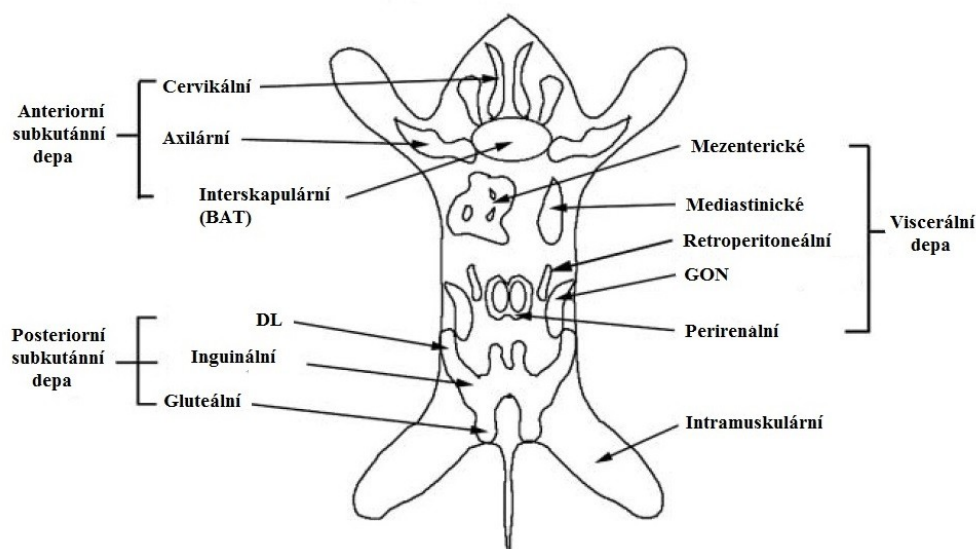
### 2.1. Tuková tkáň

Tuková tkáň je složena převážně z tukových buněk, tzv. adipocytů, a tak zvané stroma vaskulární frakce (SVF), obsahující rezidentní makrofágy, endoteliální buňky (Curat et al. 2004), mezenchymální progenitorové buňky či preadipocyty (Han et al. 2015). Tuková tkáň je multifunkční orgán, který kromě své primární funkce ukládat a hospodařit s lipidy podle aktuálního nutričního stavu jedince, zastupuje také velmi významnou úlohu endokrinního orgánu. Molekuly produkované tukovou tkání, tzv. adipokiny, se podílí na celé řadě metabolických procesů a zajišťují tak udržení energetické homeostázy.

Tuková tkáň netvoří jeden kompaktní celek, ale je dispergovaná po celém těle. Oblasti, ve kterých se jednotlivá tuková depa vyskytují, jsou nicméně lokalizovány a popsány. Obecně lze tukovou tkáň rozdělit podle morfologie a funkce na bílou (WAT - z angl. white adipose tissue) a hnědou tukovou tkáň (BAT - z angl. brown adipose tissue), nebo podle lokalizace v těle na subkutánní (podkožní) a viscerální (útrobní).

U myši, které jsme používali jako modelová zvířata, se subkutánní tkáň dále dělí na dvě depa – anteriorní a posteriorní. Anteriorní subkutánní depo se nachází na vrchní straně hřbetu a dále se rozlišuje na interskapulární, axilární, cervikální, příp. subskapulární depo. Posteriorní subkutánní depo se člení na dorzolumbální (DL), inguinální a gluteální depo. Viscerálních dep je několik a jejich dělení není zcela sjednocené, přibližné rozdělení je znázorněno na obrázku (Obr. 1). Jejich název je téměř vždy odvozen od orgánu, který obklopují, a rozlišujeme především tato depa: mezenterické (v okolí střev), retroperitoneální (v oblasti mezi pobřišnicí a zadní stěnou břišní), gonadální (GON), které dělíme podle toho, zda obklopuje varlata, či vaječníky na epidydimální a periovariální, a perirenální (okolo ledvin) (Cinti 2012). Pro tuto práci bylo stěžejní zejména GON tukové depo.

Lipidy jsou ve formě triacylglycerolů (TAG) a cholesterolesterů uloženy v adipocytech do tukových kapének, s nimiž je asociována řada proteinů (např. perilipin) (Greenberg et al. 1991; Blanchettemackie et al. 1995) a lipáz (Goodman 2008), které jsou důležitými komponentami lipidového metabolismu (viz. kapitola 2.4.3. Lipolýza).



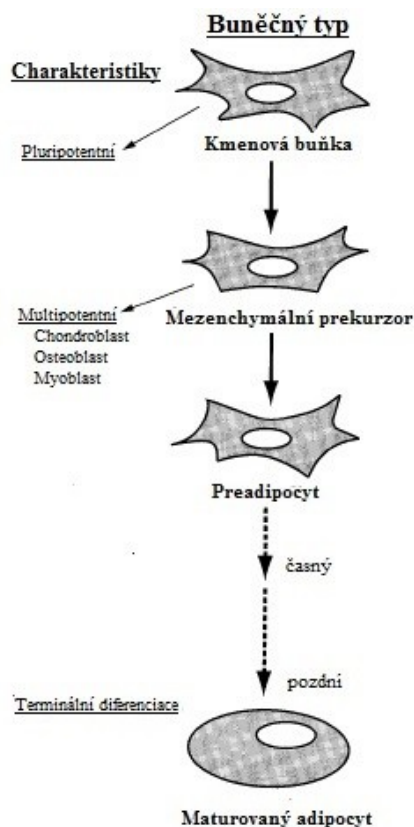
**Obr. 1: Lokalizace tukových dep u myši**

DL - dorzolumbální tukové depo, GON - gonadální tukové depo

(převzato z (Steel et al. 2005))

Adipocyty vznikají z prekursorových buněk SVF procesem označovaným jako adipogeneze, který probíhá ve dvou stupních. V prvním kroku dochází k determinaci pluripotentních kmenových buněk do linie buněk, ze kterých jsou derivovány tzv. preadipocyty. Preadipocyt se od svých prekursorů liší pouze absencí schopnosti diferenciovat do jiného typu buněk. Druhým krokem je diferenciací preadipocytů do zralých adipocytů (Rosen and MacDougald 2006). Druhý krok vývoje adipocytů můžeme rozdělit na další 4 podstupně:

1. Zastavení růstu
2. Klonální expanze - během klonální expanze dochází v buňkách alespoň k jednomu cyklu DNA replikace a buněčného dělení
3. Časná diferenciací - v průběhu časně diferenciací buňky prochází dramatickými morfologickými změnami a dostávají klasický sférický tvar, mimo to se zvyšuje exprese lipoproteinové lipázy (LPL)
4. Terminální diferenciací - během této poslední fáze se v adipocytech ustavují a zintenzivňují pro ně typické funkce, včetně zvýšení aktivity složek účastnících se metabolismu TAG či získání senzitivity k inzulinu (Obr. 2) (Gregoire et al. 1998).



**Obr. 2: Schéma vývoje adipocytu z kmenové buňky**

*Bližší popis v textu*

(převzato z (Gregoire et al. 1998))

Adipogeneze jednotlivých dep neprobíhá současně, ale dochází k ní v různých vývojových fázích ontogeneze. Zatímco u myši se GON tukové depo objevuje postnatálně, subkutánní tuková tkáň se zakládá již mezi 14-18 dnem embryonálního vývoje (Wang et al. 2013). Podobně i retroperitoneální depo či BAT obsahuje ve svých adipocytech lipidové komponenty již první postnatální den, což nasvědčuje tomu, že k jejich vývoji dochází už ve stádiu embrya. Co se ale jeví jako společný znak pro všechna tuková depa, je nutnost kontaktu mezi buňkami a kontakt buněk s okolní matrix pro získání adipogenního charakteru progenitorových kmenových buněk (Han et al. 2011).

### 2.1.1. Bílá tuková tkáň

Bílá tuková tkáň je složena z tzv. unilokulární buněk, tedy adipocytů obsahujících jednu velkou tukovou kapénku, zaujímající téměř celý obsah buňky. Velikost adipocytů je velmi variabilní, obecně se uvádí, že se pohybuje v rozmezí 10-150  $\mu\text{m}$  v průměru

(Cinti 2008). Na periférii je tuková kapénka lemována slabou vrstvou cytoplazmy, která obsahuje jádro a malé množství mitochondrií a endoplazmatického retikula. Ostatní orgány jsou v adipocytech, v porovnání s jinými buňkami, velmi redukovány, a to jak do počtu, tak do velikosti (např. Golgiho aparát) (Cinti 2009; Cinti 2008).

#### **2.1.1.1. Zánět bílé tukové tkáně a jeho metabolické důsledky**

Dlouhodobý příjem velkého množství energie může v těle indukovat tzv. mírný systémový zánět. Lipidy se akumulují do bílých adipocytů, které zvětšují objem (tzv. hypertrofie) a zmnožují svůj počet (tzv. hyperplazie). Překročí-li se zásobní kapacita adipocytů, nebo je-li v tukové tkáni indukován zánět, začnou se lipidy ektopicky ukládat do jiných orgánů, především do svalů (de Wilde et al. 2008), jater nebo slinivky (Fraulob et al. 2010). Tímto dochází v cílových tkáních k dysfunkci buněk a k narušení, zde probíhajících, metabolických drah (Schaffer 2003). Hromadění lipidů v jaterních buňkách ve formě tukových kapének je označováno jako tzv. ztučnění jater, neboli steatóza. Jedním z důsledků vysokého příjmu lipidů je zhoršená regenerace jaterní tkáně, která je dána zvýšenou expresí inhibitoru nukleárního faktoru kappa B alfa ( $I\kappa B\alpha$ ). Jaderný faktor kappa B ( $NF-\kappa B$ ) je transkripční regulátor podílející se na expresi řady genů zahrnutých v regulaci imunitní a zánětlivé odpovědi a má inhibiční efekt na apoptózu (Bonizzi and Karin 2004). Jeho inhibice tak vede ke zhoršené schopnosti obnovovat jaterní buňky a ke zvýšené apoptóze. Mimo to, expanze tukové tkáně doprovázená zvýšenou hladinou leptinu, může stimulovat aktivitu prozánětlivého cytokinu tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  ( $TNF-\alpha$  – z angl. tumor necrosis factor), který způsobuje poškození jaterní tkáně (DeAngelis et al. 2005; Schwabe and Brenner 2006).

Hypertrofické a hyperplazické adipocyty zvyšují v tukové tkáni koncentraci prozánětlivých cytokinů. Hlavními cytokiny, podílejícími se na indukci zánětu, jsou  $TNF-\alpha$ , interleukin 6 (IL-6), interleukin  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) a monocytární chemoatraktivní protein 1 (MCP-1). Důležitým indikátorem zánětu v tukové tkáni je zvýšená hladina klasicky aktivovaných makrofágů (M1), které se infiltrují do tukové tkáně v důsledku hypertrofie adipocytů a zvýšené exprese MCP-1, který funguje jako chemoatraktant pro makrofágy (Weisberg et al. 2003). Hypertrofované adipocyty podstupují buněčnou smrt. Projevy, kterými je degradace adipocytů doprovázena, jako je např. prasknutí cytoplazmatické membrány, zvětšení endoplazmatického retikula či vylití obsahu do extracelulárního prostoru, nasvědčují spíše faktu, že jde o nekrózu, nikoli o apoptózu (Cinti et al. 2005; Ziegler and Groscurth 2004). M1 makrofágy obklopují

hypertrofované adipocyty, které podstoupily buněčnou smrt, a tvoří struktury, v angličtině označované termínem crown-like structures (CLS) (Strissel et al. 2007). Jakým způsobem stimuluje hypertrofie smrt adipocytů není dosud známo, nicméně se předpokládá, že jistou úlohu v tomto procesu sehraává buněčný stres (Cinti et al. 2005). S hypertrofií adipocytů také souvisí množství fosfoproteinu perilipinu. Perilipin je hydrofóbní protein asociovaný s tukovou kapénkou, lokalizovaný v jednovrstevné membráně lipidových kapének uvnitř adipocytů, jehož důležitou funkcí je snižovat bazální lipolýzu. Během experimentů na lidských subjektech se zjistilo, že jeho množství neroste úměrně s expanzí adipocytů. Navíc, exprese mRNA i koncentrace proteinu perilipinu jsou výrazně sniženy u obézních jedinců. Výsledkem je zvýšená bazální lipolýza, kterou nedokáže perilipin úměrně své koncentraci dostatečně utlumovat (Wang et al. 2003).

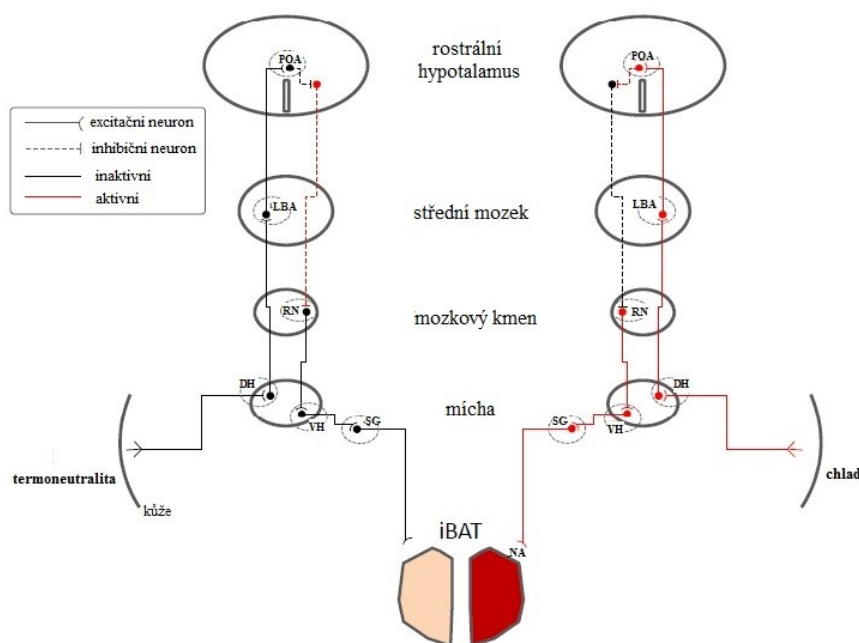
Zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů, zejména pak cytokinu TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , mohou prostřednictvím interakce se svými receptory aktivovat c-Jun-N-terminální kinázu (JNK) a kinázu inhibitoru  $\kappa$ B  $\beta$  (IKK $\beta$ ) v buňkách periferních tkání. Tyto kinázy následně fosforylují důležité komponenty inzulínové signalizační kaskády (inzulínové receptorové substráty) (Aguirre et al. 2000), nebo stimulují expresi dalších faktorů, čímž významně přispívají k indukci tzv. inzulínové rezistence (IR) (Shoelson et al. 2006). Tímto termínem je označován stav, kdy jsou buňky částečně nebo úplně rezistentní k působení inzulínu. Inzulín stimuluje utilizaci glukózy z krve do tkání, prostřednictvím zvýšené translokace glukózových transportérů typu 4 (GLUT4) do plazmatické membrány. V případě IR k tomuto nedochází a glukóza zůstává v oběhu. Stav, kdy koncentrace glukózy v krvi dosáhne hodnot  $\geq 7,0$  mmol/l, označujeme jako hyperglykémie.

### **2.1.2. Hnědá tuková tkáň**

Buňky hnědé tukové tkáně mají vysoký počet mitochondrií obsahující cytochrom b, který, spolu s vyšší mírou prokrvení, propůjčuje hnědé tukové tkáni její charakteristickou barvu a od ní odvozený název. Lipidy jsou zde, na rozdíl od bílých adipocytů, uloženy ve více menších tukových kapénkách (multilokulární buňka). Hlavní funkcí hnědé tukové tkáně je produkce tepla, tzv. netřesová termogeneze, která je řízena signály ze sympatického nervového systému, konkrétně hormonem noradrenalinem (NA) (Hsieh and Carlson 1957; Cannon and Nedergaard 2011).



Pokud je organismus vystaven okolním teplotám, při kterých je nucen zvýšit rychlost produkce metabolického tepla pro udržení stálé tělesné teploty, mluvíme o tzv. spodní kritické teplotě (Commission 2003). Organismus v takovém případě maximalizuje izolační mechanismy a snižuje prokrvení kůže a končetin (Gordon 2012). Termoneutrální zóna je termín, definující rozmezí teplot, v němž naopak nedochází ke změnám v produkci tepla či k jeho ztrátám (Kingma et al. 2011). Termoneutralita je individuální pro jednotlivé druhy živočichů, u myši, se kterými výhradně pracujeme v naší laboratoři, se toto rozmezí pohybuje v rozmezí 30-35 °C, v závislosti na typu kmene, pohlaví a věku (Stemmer et al. 2015). Pokud je myš vystavena chladu, jsou informace o okolní teplotě přijaty specifickými smyslovými senzory, tzv. termoreceptory, uloženými subepiteliálně. Signál je přenesen dostředivými drahami do preoptické oblasti hypotalamu (POA) (Morrison et al. 2008) a aktivuje zde inhibiční GABAergní interneurony. Tato inhibice zeslabí inhibiční vliv neuronů vedoucích signál z POA do mozkového kmene, konkrétně do oblasti označované jako raphe nuclei. Výsledkem této dráhy je zvýšené uvolňování NA z postgangliových vláken a indukce produkce tepla v BAT (Obr. 3) (Klingenspor and Fromme 2012; Morrison 2004).



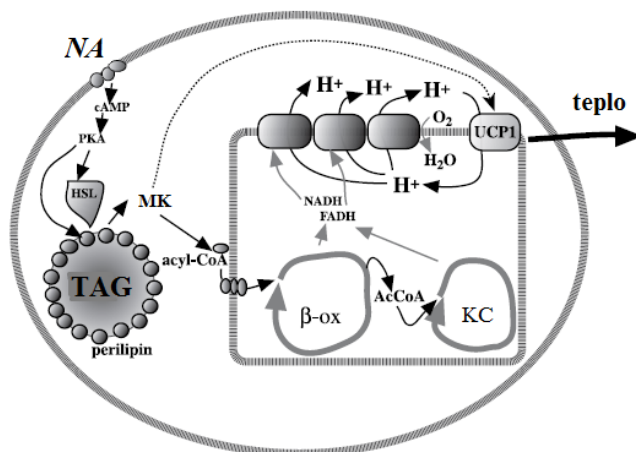
**Obr. 3: Schéma teplotního somatosenzorického reflexu**

*Bližší popis v textu*

*POA - preoptická oblast, LBA - laterální parabrachiální jádra, RN - raphe nuclei, DH - dorzální roh míšní, VH - ventrální roh míšní, SG - ganglion stellatum (hvězdčovitý tvar), iBAT - interskapulární hnědá tuková tkáň, NA - noradrenalin*

(převzato z (Klingenspor and Fromme 2012))

Po interakci NA s  $\beta 3$ -adrenergními receptory exprimovanými převážně v tukové tkáni je uvnitř adipocytů aktivována lipolýza, jejímž výsledkem je uvolnění mastných kyselin (MK) (viz. kapitola 2.4.2 Lipolýza). MK jsou následně transportovány do mitochondrií, kde jsou degradovány v procesu  $\beta$ -oxidace až na Acetyl-CoA, který je substrátem pro Krebsův cyklus. Produkty těchto dvou metabolických procesů jsou mj. redukované kofaktory, které jsou využity v procesu oxidativní fosforylace. Klasickým výtěžkem tohoto procesu je energie ve formě ATP, syntetizovaná enzymem ATP-syntázou za využití protonového gradientu na vnitřní mitochondriální membráně. Mitochondrie hnědých adipocytů však obsahují na vnitřní membráně odpráhuující protein 1 (UCP1 - z angl. uncoupling protein 1), který propouští protony z mezimembránového prostoru zpět do lumen mitochondrií ještě před tím, než jsou využity ATP-syntázou, a uvolněná energie v tomto případě je uvolněna ve formě tepla (Obr. 4) (Cannon and Nedergaard 2004). Minimální využití ATP-syntázy k tvorbě ATP je patrně příčinou relativně nízkého množství tohoto enzymu v BAT v porovnání s jinými tkáněmi, např. s játry (Cannon and Vogel 1977).



**Obr. 4: Klíčové metabolické dráhy v hnědých adipocytech**

*Bližší popis v textu*

NA - noradrenalin, PKA - protein kináza A, HSL - hormon senzitivní lipáza, TAG - triacylglyceroly, MK - mastné kyseliny,  $\beta$ -ox -  $\beta$ -oxidace, KC - Krebsův cyklus

(převzato a upraveno podle (Cannon and Nedergaard 2004))

### 2.1.3. Hnědnutí bílé tukové tkáně

Hnědnutí bílé tukové tkáně, neboli tzv. „browning“ efekt, je proces, při kterém získávají buňky bílé tukové tkáně charakter buněk hnědých. Tyto hnědé buňky nazýváme „brite“ nebo také „beige“ buňky. K tomuto fenoménu dochází po vystavení

subjektu působení chladu nebo při podávání  $\beta$ 3-adrenergických agonistů (Guerra et al. 1998; Cousin et al. 1992; Young et al. 1984).  $\beta$ 3-adrenergní agonista, mimetizující účinek NA, spouští v buňce kaskádu reakcí vedoucí k indukci netřesové termogeneze.

V souvislosti s výskytem „brite“ buněk se zjistilo, že na jejich indukci se spolupodílí enzym cyklooxygenáza-2 (COX-2), který katalyzuje syntézu prostaglandinů a tromboxanů z kyseliny arachidonové. Produkty této metabolické dráhy, prostaglandiny, směřují diferenciaci mezenchymálních prekursorů směrem k fenotypu hnědých buněk (Vegiopoulos et al. 2010).

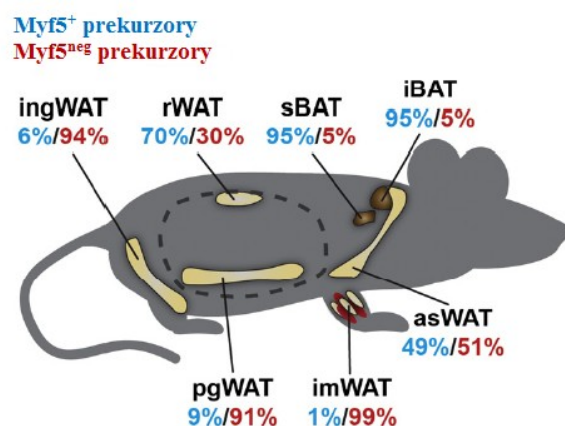
Podobná role jako u produktů COX-2 byla nalezena u nově objeveného hormonu irisinu. Tento peptidový hormon je v těle indukován během fyzické námahy a sekretován do krevního oběhu. Jeho exprese je regulována koaktivátorem receptoru aktivovaného proliferátorem peroxisomů  $\gamma$  1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ). Také on pozitivně ovlivňuje hnědnutí WAT a zvyšuje expresi UCP1 (Bostrom et al. 2012), přičemž k zvýšení jeho exprese v BAT a kosterním svalu dochází právě u myší v chladu (Puigserver et al. 1998).

Pozoruhodné je, že výskyt "brite" buněk je pozorován také u myší v postnatálním vývoji, aniž by byly vystaveny působení chladu. Jedná se o přechodné hnědnutí WAT, které dosahuje v každém z jednotlivých tukových dep odlišného rozsahu. Již 10. den po narození jsou v různých depech bílé tukové tkáně pozorovány ostrůvky multilokulárních buněk, které se barví UCP1 pozitivně a jejich počet se zvyšuje až do 20. dne (Lasar et al. 2013; Xue et al. 2007). Význam tohoto efektu není doposud zcela objasněn. Existují hypotézy, že jde o reakci na přechod z kojení na standardní dietu, nebo na behaviorální či teplotní stresory spojené s opouštěním hnízda (Lasar et al. 2013).

## **2.2. Vývoj a původ adipocytů**

Bílé a hnědé adipocyty vznikají z odlišných prekursorů mezodermálního původu, tzv. myogenních faktorů 5 (Myf5). Adipocyty hnědé tukové tkáně jsou odvozeny z mezenchymálních Myf5<sup>+</sup> kmenových buněk, derivovaných z paraxiálního mezodermu, které jsou společné mj. i pro kosterní svalstvo. Bílé adipocyty vznikají z Myf5<sup>-</sup> progenitorových buněk. Myf5<sup>-</sup> prekursorů jsou derivovány z pericytům podobných buněk, které jsou asociovány s krevními kapilárami a pochází z laterálního mezodermu (Tang et al. 2008; Enerback 2009). Toto rozdělení nelze považovat za zcela

striktní, téměř ve všech tukových depech se totiž setkáme se zastoupením adipocytů pocházejících z obou typů prekurzorů (Obr. 5).



**Obr. 5: Procentuální zastoupení Myf5<sup>+</sup>/Myf5<sup>neg</sup> prekurzorů v jednotlivých tukových depech**

*ingWAT* - inguinální bílá tuková tkáň, *rWAT* - retroperitoneální bílá tuková tkáň, *pgWAT* - perigonadální bílá tuková tkáň, *imWAT* - intermuskulární bílá tuková tkáň, *sBAT* - subskapulární hnědá tuková tkáň, *iBAT* - interskapulární hnědá tuková

(převzato z (Sanchez-Gurmaches and Guertin 2014))

K objasnění původu „brite“ buněk byly navrženy dvě hypotézy. Buď mohou „brite“ buňky vznikat z již zralých adipocytů bílé tukové tkáně procesem tzv. transdiferenciace, nebo jejich původ vychází z unikátní linie preadipocytů.

Transdiferenciace, neboli interkonverze, je dána schopností adipocytů reverzibilně konvertovat z jednoho typu do druhého. Některé publikace dokládají proces interkonverze výskytem tzv. paucilokulárních buněk, které jsou přechodným typem buněk mezi hnědými a bílými adipocyty. Tento typ obsahuje jednu větší tukovou kapénku obklopenou několika menšími. Typickým znakem je také vyšší počet mitochondrií, které mohou být UCP1 pozitivní (Cinti 2009; Barbatelli et al. 2010). Dalším důkazem transdiferenciace z jednoho typu adipocytů do druhého je experiment, v rámci kterého byly myši vystaveny chladové expozici (8 °C) po dobu 1 týdne, během níž došlo k patrnému hnědnutí v inguinálním tukovém depu. Tento proces byl po 5 týdnech, kdy byly myši opět vráceny do pokojové teploty (23 °C), sledován jako reverzibilní, aniž by došlo k úbytku či nárůstu počtu buněk (Rosenwald et al. 2013).

Na druhé straně, vznik adipocytů z prekurzorů *de novo* je podložen také řadou experimentů. Již zmíněná COX-2 je jedním z ukazatelů, že vhodným a dostatečným

stimulem lze indukovat vznik buněk s fenotypem hnědých adipocytů z mezenchymálních prekursorů (Vegiopoulos et al. 2010; Wu et al. 2012). Závěry studie N. Petrovic a kol. uvádí, že během experimentu nebyla pozorována skutečná transdiferenciace původních bílých adipocytů ani na buněčných kulturách, ani *in vivo*, a dále tvrdí, že "brite" buňky pochází z buněk nediferenciovaných, nikoliv z buněk, které by vykazovaly charakter bílých adipocytů (Petrovic et al. 2010).

V současnosti se jako nejpravděpodobnější vysvětlení jeví hypotéza, že dochází k oběma jevům, tedy transdiferenciaci i *de novo* proliferaci, a to, jakým způsobem "brite" buňky vzniknou, ovlivňuje typ depa a doba trvání stimulace (chladová expozice,  $\beta$ 3-adrenergní stimulace aj.) (Sanchez-Gurmaches and Guertin 2014).

Klíčovým faktorem pro vývoj adipocytů jsou jaderné receptory z rodiny PPARs (Peroxisome proliferator-activating receptors/receptory aktivované peroxizómovými proliferátory). PPARs řadíme do skupiny steroidních, tyreoidálních receptorů a receptorů kyseliny retinové (Svacina et al. 2008) a rozlišujeme v současnosti jejich tři izoformy  $\alpha$ ,  $\delta$  a  $\gamma$ . PPAR $\gamma$  je exprimován především v tukové tkáni a alternativním sestřihem jeho genu vznikají dvě izoformy PPAR $\gamma$ 1 a PPAR $\gamma$ 2. PPAR $\gamma$  spolu s transkripčním faktorem C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) indukuje první fázi determinace preadipocytů, tedy se podílí na zastavení jejich růstu, a dále řídí procesy během terminální diferenciaci (Vazquez-Vela et al. 2008; Rosen et al. 1999; Umek et al. 1991).

S diferenciací prekursorových buněk souvisí další transkripční koregulátor, PRDM16 (PR doménu obsahující 16). V BAT stimuluje diferenciaci prekursoru v hnědý adipocyt prostřednictvím vazby k jadernému receptoru PPAR $\gamma$  a jeho následné aktivace (Seale et al. 2008). Mimo BAT je exprimován také v subkutánní tukové tkáni, kde indukuje vývoj "brite" buněk a zprostředkovává tak adaptivní termogenezi (Seale et al. 2011).

Úloha leptinu v diferenciaci adipocytů je stále spekulativní. Uvádí se, že jeho exprese je indukována již během terminální diferenciaci preadipocytů (Macdougald et al. 1995). Existují práce, které prokazují inhibiční vliv leptinu na adipogenezi demonstrovanou supresivním efektem na aktivitu glycerol-3-fosfát dehydrogenázy, která je markerem terminální diferenciaci (Ambati et al. 2007). Podobné výsledky publikuje ve své práci i Wagoner a kol. (Wagoner et al. 2006). Naproti tomu existují experimenty, během kterých pozorovali naopak stimulační efekt leptinu na proliferaci

preadipocytů (Machinal-Quelin et al. 2002). Odlišné závěry jsou připisovány použití různých buněčných systémů v jednotlivých experimentech (Ambati et al. 2007).

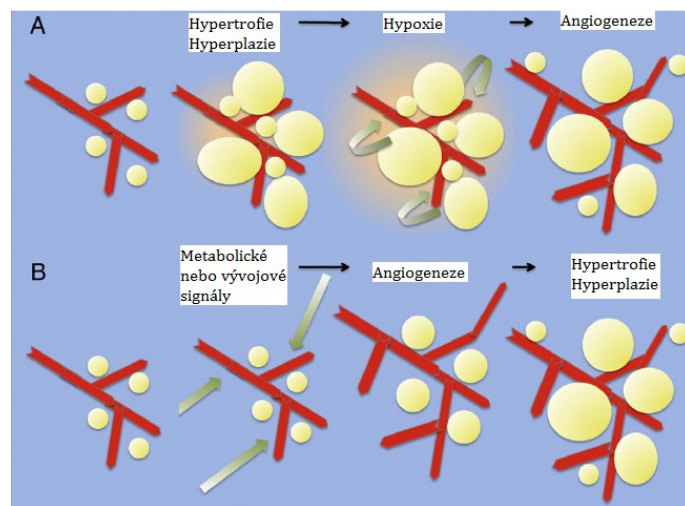
### 2.3. Vaskularizace

Tuková tkáň má schopnost remodelovat se, tedy expandovat a redukovat, během celého života. V extrémních případech dokáže u obézních jedinců zaujmout až 40% celkového tělesného objemu, což odpovídá indexu tělesné hmotnosti (BMI - z angl. body mass index)  $\geq 30$  (Corvera and Gealekman 2014). Nárůst tukové tkáně během života může být v případě hyperplazie doprovázen neovaskularizací, v případě hypertrofie adipocytů remodelací již existujících cév (Hausman and Kauffman 1986; Christiaens and Lijnen 2010).

Řada výzkumů ukázala, že pro správný vývoj tukové tkáně je naprosto nezbytná vaskularizace. Je známo, že tuková tkáň je mimo jiné také významným endokrinním orgánem, který produkuje řadu bioaktivních molekul a lipidových mediátorů. Pro šíření bioaktivních látek dále po těle je přítomnost správně vyvinuté sítě krevních kapilár naprosto nepostradatelná. V případě hnědé tukové tkáně je hustá síť kapilár nezbytná pro zásobování metabolicky velmi aktivních buněk kyslíkem a následně k odvádění disipovaného tepla vzniklého na vnitřních mitochondriálních membránách prostřednictvím odpráhujícího proteinu UCP1 (Christiaens and Lijnen 2010). Během vývoje plodu předchází vývoji adipocytů vývoj cév. Kapiláry se utváří *de novo* z prekursorů derivovaných z mezodermu, tzv. angioblastů.

V současnosti existují dvě hypotézy, které se snaží o vysvětlení principu, jak je angiogeneze stimulována během růstu tukové tkáně v dospělosti za podmínek zvýšeného kalorického příjmu:

1. Zvýšený kalorický příjem má za následek hypertrofii a hyperplazii adipocytů, díky čemuž se v tkáni vytváří oblasti hypoxie. Tento stav spolu s dalšími faktory uvolňovanými z tukové tkáně indukuje angiogenezi.
2. Zvýšený kalorický příjem vyvolává změny v hladinách trofických faktorů jako je např. inzulin, který přímo ovlivňuje angiogenezi. Zvýšená angiogeneze následně přispívá k ukládání lipidů do adipocytů, což vede k hyperplazii (Obr. 6) (Corvera and Gealekman 2014).



**Obr. 6: Dva hypotetické modely vysvětlující stimulaci angiogeneze během růstu tukové tkáně**  
*Bližší popis v textu.*

(převzato z (Corvera and Gealekman 2014))

Tukové buňky se samy podílí na sekreci proangiogenních i protiangiogenních faktorů, včetně dvou hlavních - vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF-A) a hepatocytárního růstového faktoru (HGF) (Bell et al. 2008). Pozoruhodné je, že mezi pro- či protiangiogenní faktory se řadí i dva hlavní adipokiny, totiž leptin a adiponektin (Christiaens and Lijnen 2010).

Leptin je peptidový hormon produkovaný adipocyty (více v kapitole 2.4.3. Leptin), který dokáže přímo ovlivnit indukci angiogeneze prostřednictvím interakce se svými receptory lokalizovanými na endoteliálních buňkách cév. Principem regulace je interakcí aktivovaná STAT3 signalizační kaskáda (z angl. - signal transducer and activator of transcription 3) (Sierra-Honigmann et al. 1998). Prostřednictvím této signální dráhy může leptin indukovat angiogenezi i nepřímo, zvýšenou regulací exprese VEGF (Suganami et al. 2004).

Naproti tomu u adiponektinu byl zaznamenán spíše antiangiogenní efekt. Ve studii Brakenhielma a kol. byl adiponektin označen jako "přímý endogenní inhibitor angiogeneze" pro svou schopnost indukovat apoptózu endoteliálních buněk aktivací specifických kaspáz (Brakenhielm et al. 2004).

## 2.4. Adipokiny

### 2.4.1. Adiponektin

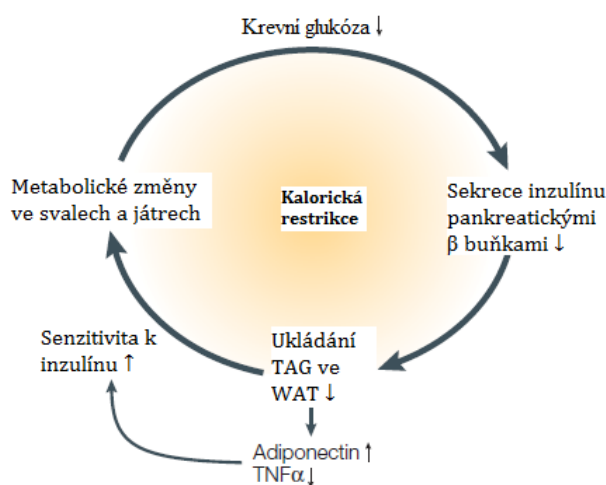
Adiponektin je adipocyty derivovaný plazmatický protein o velikosti 30 kDa. Strukturně je adiponektin tvořen 4 doménami: globulární, variabilní, doménou kolagenních repetic a amino-terminální signální sekvencí. V těle cirkuluje ve formě homotrimerů nebo oligomerů, které jsou tvořené jednotlivými homotrimery spojenými disulfidickými vazbami (Scherer et al. 1995). Jeho hladiny jsou, oproti ostatním adipokinům, redukovány u subjektů trpících obezitou (Hu et al. 1996; Arita et al. 1999).

Adiponektin má v těle řadu protektivních funkcí. Působí inhibičně na expresi endoteliálních adhezních molekul, která je indukována dalším z řady adipokinů, TNF- $\alpha$ , čímž snižuje riziko tvorby tzv. aterosklerotických lézí (Ouchi et al. 2000). Dalším benefičním účinkem adiponektinu je stimulace procesů v kosterním svalu, které vedou ke snížení obsahu TAG, jako je např. exprese molekul účastnících se transportu MK (CD36), nebo molekul  $\beta$ -oxidace (acyl koenzym A oxidáza). Ke stimulaci těchto dějů dochází patrně prostřednictvím zvýšení exprese PPAR $\alpha$  (Yamauchi et al. 2001). Adiponektin dále aktivuje AMP-aktivovanou proteinovou kinázu (AMPK). Zvýšení její aktivity má za následek zvýšení utilizace glukózy ve svalových buňkách a stimulaci  $\beta$ -oxidace v myocytech a hepatocytech (Yamauchi et al. 2002).

Adiponektin cirkuluje v plazmě v koncentraci o řád vyšší, než je tomu např. v případě leptinu ( $\mu\text{g/ml}$  vs.  $\text{ng/ml}$ ) a je tak nejhojněji zastoupeným adipokinem v plazmě (Fantuzzi 2005). Zároveň se jeho hladiny pohybují v širokém rozpětí, které je dáno např. odlišnými koncentracemi adiponektinu u samic a samců (Combs et al. 2003), resp. u žen a mužů (Arita et al. 1999; Hotta et al. 2000). Na expresi adiponektinu v tukové tkáni má vliv řada aspektů. Pozitivní vliv na jeho expresi má skupina uměle syntetizovaných antidiabetik, tzv. thiazolidindionů (TZD). TZD fungují jako ligandy již zmiňovaného jaderného receptoru PPAR $\gamma$ , prostřednictvím něhož aktivují promotory genu pro adiponektin a zvyšují jeho expresi i sekreci. Celkově tak TZD zlepšují inzulinovou signalizaci a protektivně působí proti rozvoji aterosklerózy u pacientů trpících diabetem (Maeda et al. 2001). Antagonisticky k účinkům TZD působí inzulín a TNF- $\alpha$ , kteří reverzibilně snižují hladiny mRNA adiponektinu (Fasshauer et al. 2002). Dalším z parametrů, který může ovlivňovat hladiny adiponektinu, je kalorická restrikce. Kalorická restrikce je režim, během kterého je omezen příjem potravy, přičemž je zachován dostatečný kalorický příjem. Dlouhodobé studie ukázaly, že kalorická



restrikce má pozitivní vliv nejen na hladiny adiponektinu (Combs et al. 2003; Zhu et al. 2004), ale že rovněž působí i protiateroskleroticky (Obr. 7) (Fontana et al. 2004). Nejen režim podávání potravy, ale i složení diety samotné může mít vliv na hladiny plazmatického adiponektinu. V laboratoři Oddělení biologie tukové tkáně byl proveden experiment, v němž byly myši krmeny dietou se zvýšeným obsahem omega 3 polynenasycených mastných kyselin (omega 3 PUFA), jako je dokosahexaenová nebo eikosapentaenová kyselina. Omega 3 PUFA kromě jiného zvyšovaly koncentraci adiponektinu v plazmě (Rossmeisl et al. 2012).



**Obr. 7: Schéma působení kalorické restrikce**

Se sníženým kalorickým příjmem klesá koncentrace glukózy v krvi, což má za následek nižší sekreci inzulínu pankreatickými β buňkami. Nízká koncentrace inzulínu vede k mobilizaci TAG z WAT, a tudíž ke zvýšené koncentraci adiponektinu, který redukuje produkci TNF-α a reguluje inzulínovou senzitivitu v periferních tkáních.

(převzato z (Bordone and Guarente 2005))

## 2.4.2. Rezistin

Rezistin je nedávno objevený protein produkovaný tukovou tkání, který ve své struktuře obsahuje vysoké procento polární aminokyseliny, cysteinu (Kim et al. 2001). Jak se zjistilo, ne u všech druhů živočichů je exprese rezistinu výhradně otázkou tukové tkáně, jako je tomu např. u myši. U lidí se na expresi tohoto proteinu nejvýznamněji podílí kostní dřeň a makrofágy (Patel et al. 2003), přičemž v adipocytech je exprese, v porovnání s výše jmenovanými, prakticky zanedbatelná (Savage et al. 2001; Patel et al. 2003). Na řízení exprese rezistinu se podílí široká škála hormonů a cytokinů. V experimentech prováděných *in vitro* se ukázalo, že zatímco vysoká koncentrace glukózy

v krvi expresi rezistinu indukují, zástupci z řad TZD ji utlumují. Supresivní účinek na jeho expresi byl také objeven, poněkud překvapivě, u prozánětlivého cytokinu TNF- $\alpha$ , který se v současnosti dokonce jeví jako jeden z hlavních regulátorů exprese rezistinu (Shojima et al. 2002).

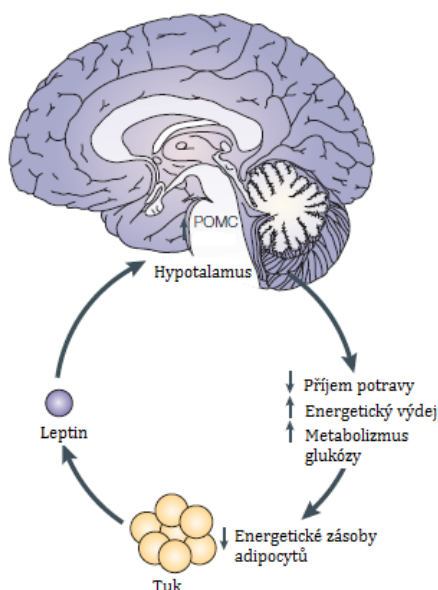
Plazmatické hladiny rezistinu jsou, podobně jako u většiny adipokinů, zvýšené u myši trpících obezitou. Tato korelace podporuje hypotézu, že rezistin je negativním přispěvatelem k rozvoji obezity a následného diabetu 2. typu (Steppan et al. 2001).

Rezistin snižuje senzitivitu buněk k inzulinu, především v kosterních svalech, játrech a v tuku a negativně působí na diferenciaci adipocytů během adipogeneze, princip jeho působení však není zatím zcela objasněn (Kim et al. 2001).

### 2.4.3. Leptin

Tento peptidový hormon o velikosti 16 kDa je produktem *ob* genu lokalizovaného na 7. chromozomu (Halaas et al. 1995; Campfield et al. 1995) a hraje důležitou úlohu v udržování energetické homeostázy. Zprostředkovává mj. informaci o velikosti tukové hmoty centrálnímu nervovému systému skrze interakce s leptinovými receptory (LRb) v hypotalamu. Množství leptinu roste s přibývajícím množstvím tělesného tuku. Odpovědí na tuto energetickou imbalance je zpětnovazebná regulace snížení příjmu potravy, která je dána anorexigenním účinkem leptinu v laterálních jádrech hypotalamu (LHA) prostřednictvím zvýšené aktivity proopiomelanokortinových neuronů (POMC) (Cowley et al. 2001). Druhou odpovědí nervového systému vedoucí k dosažení energetické rovnováhy je zvýšení energetického výdeje, prostřednictvím stimulace  $\beta$ -oxidace MK ve svalech a inhibice vazby inzulinu na jeho receptory v adipocytech (Walder et al. 1997) a jaterních buňkách (Nowak et al. 1998). Touto blokací leptin suprimuje inhibiční účinek inzulinu na lipolýzu a naopak jeho stimulační efekt na lipogenezi (Obr. 8) (Muller et al. 1997). Pokud tento zpětnovazebný mechanismus nefunguje, hovoříme o tzv. leptinové rezistenci. Během experimentu prováděného na myších náchylných k dietou indukované obezitě se zjistilo, že rezistence k působení leptinu v mozku není globální. Leptinovou rezistenci vykazovala ve výsledku pouze oblast označovaná jako nucleus arcuatus, která je součástí středního hypotalamu (Munzberg et al. 2004). Blokace odpovědi na působení leptinu je pravděpodobně zapříčiněna více faktory. Jedním z nich je zvýšená exprese supresoru cytokinové signalizace 3 (SOCS-3 - z angl. suppressor of cytokine signalling 3), který blokuje STAT3 signalizační kaskádu, zprostředkovávající transdukcí signálu po interakci leptinu se svými receptory

(Bjorbaek et al. 1998). Druhým faktorem je možná blokáce přístupu leptinu k místům jeho působení v oblasti hypotalamu (El-Haschimi et al. 2000).



**Obr. 8: Regulace množství tukové tkáně leptinem**

*Expanze tukové tkáně vede ke zvýšení koncentrace leptinu, který zpětnovazebně snižuje příjem potravy prostřednictvím anorexigenního účinku proopiomelanokortinových neuronů (POMC) v hypotalamu. Zároveň stimuluje energetický výdej a metabolismus glukózy.*

(převzato z (Crowley et al. 2002))

Leptin je bioaktivní molekula produkovaná zejména tukovou tkání, na jeho sekreci se však do jisté míry podílí i žaludek (Bado et al. 1998), placenta (Ashworth et al. 2000; Masuzaki et al. 1997) či srdeční kardiomyocyty. Nejvyšší míra exprese leptinu u potkanů byla změřena v levé a pravé síni (Purdham et al. 2004). Leptin v srdci kromě dalších regulací zvyšuje oxidaci MK, nikoliv však přes aktivaci AMPK (Atkinson et al. 2002), ale prostřednictvím aktivace STAT3 signální kaskády a mitogenem aktivované proteinkinázy p38 (MAPK) a dále prostřednictvím zvýšení koncentrace oxidu dusnatého. Leptinem stimulovaná degradace MK má za následek pokles srdeční funkce (Sharma et al. 2009).

Plazmatická koncentrace leptinu je obecně vyšší u obézních subjektů než u štíhlých a podobně jako u adiponektinu má na tuto hladinu vliv také pohlaví. Samice myši mají vyšší hladiny leptinu v plasmě než samci, a to i v případě, že je tato

koncentrace vztažena na množství tělesného tuku (Frederich et al. 1995; Saad et al. 1997).

Podle studie Zhanga a kol. spolu koreluje množství mRNA leptinu a velikost adipocytů v epididymálním, inguinálním a retroperitoneálním tukovém depu (Zhang et al. 2002).

Jak již bylo zmíněno výše, hlavním zdrojem leptinu je bílá tuková tkáň, nicméně je důležité podotknout, že každé z tukových dep se na celkové expresi mRNA podílí odlišnou měrou (Oliver et al. 2001). Podle studie P. Trayhurna a kol. převládá genová exprese leptinu u dospělých hlodavců ve viscerální tukové tkáni, zejména pak v gonadálním a perirenálním depu (Trayhurn et al. 1995), zatímco u lidí je exprese leptinu vyšší v subkutánní tkáni (Hube et al. 1996; Rayner and Trayhurn 2001). Navzdory řadě publikací, ve kterých byla naměřena exprese mRNA leptinu v BAT (Oliver et al. 2001; Moinat et al. 1995), se stále vedou diskuze, do jaké míry skutečně BAT k celkové expresi leptinu přispívá, a jestli tato měřitelná hladina není důsledkem výskytu bílých adipocytů rozptýlených v BAT (Cinti et al. 1997).

Zajímavé je, že u myší v postnatálním období nepozorujeme v hladinách leptinu závislosti typické pro plazmatické koncentrace leptinu u dospělých jedinců. U myší v druhém týdnu života byly zaznamenány významné výkyvy v hladinách leptinu, aniž by docházelo ke změnám v procentuálním zastoupení tělesného tuku. Koncentrace leptinu v plazmě u samic kmene C57BL/6J vykazovaly 5-10x vyšší hodnoty mezi 7. a 10. postnatálním dnem a klesly po přechodu z kojení na pevnou stravu. Podobný trend byl pozorován i v hladinách mRNA leptinu. Navíc, myši, které byly vystaveny hladovění, nevykazovaly žádné poklesy v plazmatických koncentracích leptinu, v porovnání s dospělými jedinci (Ahima et al. 1998; Ahima et al. 1996). Vysvětlení pro tyto zvýšené hladiny leptinu u myší v prvních postnatálních dnech života se různí. Zatímco některé studie tvrdí, že jde o reakci na vysoký obsah tuků v mateřském mléce (Devaskar et al. 1997), jiní tuto hypotézu popírají s opodstatněním, že by muselo docházet i k nárůstu plazmatické koncentrace TAG nebo tělesného tuku, což nebylo prokázáno (Ahima et al. 1998). Zvýšená exprese leptinu v raném období a dále jeho vzájemné vztahy s jinými hormony, např. s kortikosteronem nebo thyroxinem, vede tedy k domněnce, že leptin, kromě své primární funkce udržovat energetickou rovnováhu v těle, hraje také úlohu možného regulátoru ve vývoji neuroendokrinní osy a její funkce (Ahima et al. 1998).

## 2.5. Metabolismus lipidů

Lipidy jsou přirozeně se vyskytující nízkomolekulární látky nerozpustné ve vodě a v polárních rozpouštědlech. Obecně je můžeme klasifikovat do tří skupin na jednoduché (glyceridy, vosky), složené (fosfolipidy, glykolipidy, lipoproteiny) a odvozené lipidy a jejich prekurzory (např. MK, steroidy). Lipidy přijímané potravou jsou z 90 % tvořeny TAG, které jsou významným zdrojem metabolické energie. Oxidativní odbourávání TAG poskytuje přibližně dvojnásobné množství energie (~ 38 kJ/g), než je tomu v případě sacharidů (~ 17 kJ/g) (Voet and Voetova 1994).

### 2.5.1. Transport lipidů

Transport lipidů je široký pojem, kterým rozumíme přenos lipidů na úrovni buněk, tzv. intra- a intermembránový transport, ale rovněž také transport lipidů, přijatých v potravě, počínaje jejich vstřebáváním. Pro tuto práci se zaměříme podrobněji na transport lipidů přijatých v potravě.

Tuky jsou částečně rozkládány již v ústech slinnými lipázami a v žaludku žaludečními lipázami. Zde se však lipázy dostávají do kontaktu s pepsinem, enzymem produkovaným sekrečními buňkami žaludku, který rozkládá bílkoviny a štěpí tedy i glykoproteinovou strukturu lipáz. K zásadnímu rozkladu TAG dochází až v horní části tenkého střeva, v duodenu. Důležité složky účastníci se této hydrolýzy jsou sem dopravovány ze slinivky v případě pankreatické lipázy nebo kolipázy a z jater v případě žlučových kyselin. Kolipáza je protein potřebný pro aktivaci pankreatické lipázy, která, na rozdíl od slinných a žaludečních lipáz, hydrolyzuje TAG specificky v pozici 1. a 3 esterové vazby. Výsledkem je vznik dvou volných MK a 2-monoacylglycerolu. 2-monoacylglyceroly a volné MK za pomoci žlučových kyselin agregují do tzv. micel tak, že vně jsou orientovány polární části a do středu směřují hydrofobní řetězce. Micely jsou v této fázi na povrchu hydratované a jejich velikost je dostatečně malá na to, aby byly schopny adherovat na povrch enterocytů a prostou či usnadněnou difúzí prostupovat dovnitř střevních buněk. Zde jsou 2-monoacylglyceroly opětovně esterifikovány s volnými MK za vzniku TAG. Vzniklé TAG se formují do chylomikronů, které posléze opouští enterocyty a putují lymfou do hrudního mizovodu. Z hrudního mizovodu, který ústí do levé podklíčkové cévy, se chylomikrony dostávají do krevního oběhu, kde jsou následně hydrolyzovány LPL na glycerol a MK. Volné MK se v krvi reversibilně váží na sérový protein albumin, který je transportuje na místa

potřeby. Zbytky chylomikronů jsou vychytávány játry a využity pro syntézu dalších lipoproteinů (Ganong 1995).

V játrech jsou syntetizovány lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL), zodpovědné za transport TAG k periferním tkáním. Jejich rozpadem v krevním řečišti, za přispění lipoproteinové lipázy a transportního proteinu přenášejícího estery cholesterolu, vznikají lipoproteiny o střední hustotě (IDL), které jsou, podobně jako zbytky chylomikronů, zpětně vychytávány játry. Zde podstupují degradaci, nebo jsou hydrolyzovány na lipoproteiny o nízké hustotě (LDL). LDL jsou již z větší části tvořeny cholesterolem, oproti dříve zmiňovaným lipoproteinům, u kterých převládal podíl TAG. Jejich hlavní funkcí je tedy transportovat cholesterol k periferním tkáním. Pro jejich vysoký obsah cholesterolu a relativně dlouhou životnost v krevním řečišti, jsou významným přispěvatelem k rozvoji aterosklerózy. Posledním z výčtu lipoproteinů jsou lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL) (Ganong 1995). HDL působí naopak protiskleroticky a to hned několika mechanismy. Primární funkcí HDL je vychytávání cholesterolu a jeho transport zpět do jater. Inhibují expresi adhezních molekul na buňkách endotelu (Cockerill et al. 1995), působí antioxidačně prostřednictvím inhibice exprese cytokinů (např.  $\text{TNF}\alpha$ ) (Sanossian et al. 2007) a inhibují oxidaci LDL (Mackness et al. 1993).

Závěry studií na lidských subjektech uvádí, že plazmatické hladiny adiponektinu pozitivně korelují s HDL cholesterolem a negativně s TAG v plazmě. Při poklesu koncentrace adiponektinu dochází ke snížení HDL cholesterolu, což je patrně důsledkem zvýšené aktivity jaterní lipázy (Cnop et al. 2003). V transportu lipidů sehrává pravděpodobně svou úlohu i leptin. U obézních *ob/ob* a *db/db* myši s genetickou mutací v genu kódujícím leptin, popř. v genu pro leptinový receptor, byly naměřeny významně zvýšené hladiny HDL cholesterolu v plazmě (Nishina et al. 1994; Silver et al. 1999). Překvapující je toto zjištění především s ohledem na množství HDL cholesterolu v plazmě u jinak geneticky mutovaných myších modelů a u lidských pacientů trpících obezitou, u nichž jsou tyto hladiny velmi redukovány. To nasvědčuje tomu, že metabolismus HDL cholesterolu, zejména pak HDL apolipoproteinů, by mohl být ovlivňován mj. i prostřednictvím leptinové signalizace (Silver et al. 1999).

### **2.5.2. Lipogeneze**

Lipogeneze je souhrnný termín pro syntézu MK a posléze syntézu TAG. K těmto biosyntetickým dějům dochází v játrech a v menší míře i v tukové tkáni. Míra syntézy

MK se odvíjí od složení a míry příjmu potravy. Dieta bohatá na PUFA snižuje lipogenezi (Jump et al. 1994), zatímco příjem potravy s vysokým zastoupením cukrů lipogenezi stimuluje a to v obou typech tkání (Kersten 2001). Tento proces má význam v tom, že tuky, na rozdíl od cukrů, poskytují vyšší energetickou kapacitu (38 kJ/g vs. 17 kJ/g). Většinu lipidů získáváme z potravy, v případě omega-3 PUFA je to hlavní způsob, kterým mohou být do těla přijaty, protože jsou esenciální a tělo si je dokáže samo syntetizovat jen ve velmi omezené míře (Bezard et al. 1994).

Syntéza MK probíhá v cytozolu a stává se ze 7 enzymatických reakcí. Výchozím substrátem pro syntézu MK je acetyl-CoA, který je produktem Krebsova cyklu. Acetyl-CoA je konvertován pomocí acetyl-CoA karboxylázy na malonyl-CoA. Tato konverze je rychlost limitujícím krokem celé syntézy. Malonyl-CoA i acetyl-CoA posléze vymění koenzym A za protein přenášející acyly (ACP). Oba meziprodukty podstupují sled dalších reakcí, které probíhají na multienzymatickém komplexu syntázy MK. Jejich kondenzací vzniká  $\beta$ -oxoacyl-ACP, který je redukován a následně dehydratován na  $\alpha,\beta$ -trans-butenoyl-ACP. Další redukcí vzniká butyryl-ACP, který je o 2 uhlíky delší, než byl výchozí acetyl-ACP. V obou redukčních reakcích je jako koenzym využit NADPH. Celý tento proces se opakuje max. 6x a výsledkem je v tom případě 16 uhlíkatá MK - palmitát. Ta může být prekurzorem pro další MK, vznikající působením elongáz a desaturáz, tentokrát již ve specifických buněčných organelách (mitochondrie, endoplazmatické retikulum) (Voet and Voetova 1994).

Pro tvorbu TAG jsou zapotřebí MK aktivované vazbou na CoA za účasti acyl-CoA syntetázy. Acyl-CoA jsou poté postupně esterifikovány na kostru glycerol-3-fosfátu (G-3-P). Navázáním prvního acylového řetězce, katalyzované glycerol-fosfát acyltransferázou (GPAT), vzniká nejprve lysofosfatidová kyselina (LPA), která je enzymem acylglycerol-fosfát acyltransferázou (AGPAT) opětovně esterifikována za vzniku fosfatidové kyseliny (PA). PA může být využita jako prekurzor pro syntézu fosfolipidů (např. fosfatidylinositolu), nebo je za katalytického působení fosfatidát hydrolázy hydrolyzována na diacylglycerol (DAG). Posledním krokem syntézy je acylace DAG diacylglycerol acyltransferázou na TAG (Coleman and Lee 2004; Coleman et al. 2000).

Proces lipogeneze je regulován i hormonálně. Inzulín, peptidový hormon sekretovaný  $\beta$  buňkami pankreatu, stimuluje lipogenezi prostřednictvím aktivace translokace glukózových přenašečů GLUT4 na membránu buněk, které vychytávají glukózu z krevního oběhu. Kromě toho aktivuje enzymy účastnící se glykolýzy a

lipogeneze (Kersten 2001) a v játrech stimuluje expresi genů kódujících lipogenní proteiny prostřednictvím transkripčního faktoru SREBP-1c (Sterol regulatory element binding protein 1c) (Foretz et al. 1999). Antagonisticky k inzulinu působí glukagon, který inhibuje lipogenezi a naopak stimuluje lipolýzu (Lefebvre and Luyckx 1969). Regulační efekt na lipogenezi vykazuje také leptin, který má supresivní účinky na expresi acetyl-CoA karboxylázy, čímž inhibuje zásadní krok syntézy MK (Bai et al. 1996).

### **2.5.3. Lipolýza**

Lipolýza je proces, při kterém dochází k hydrolýze esterových vazeb TAG a ke vzniku glycerolu a volných MK. Odehrává se uvnitř adipocytů za účasti širokého spektra enzymů a proteinů.

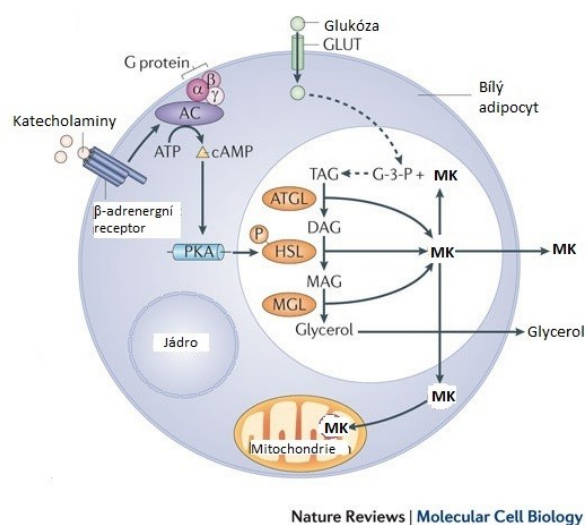
Lipolýza může probíhat buď spontánně, pak hovoříme o tzv. bazální nebo konstitutivní lipolýze, nebo je aktivována na podnět hormonů (Zhang et al. 2003). Mezi hormony schopné stimulovat proces lipolýzy řadíme zejména katecholaminy (adrenalin a noradrenalin), inzulin či natriuretické hormony (Tai and Ordovas 2007). Katecholaminy interagují se svými receptory spřaženými s G proteiny, které dělíme na 5 subtypů:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  adrenoreceptory ( $\beta$ -AR),  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$ , přičemž v bílé a hnědé tukové tkáni jsou exprimovány zejména  $\beta$ -AR (Carmen and Victor 2006). Signál je dále přenesen prostřednictvím G proteinu na adenylát cyklázu (AC) a dochází k tvorbě cyklického AMP (cAMP). Přítomnost cAMP aktivuje mimo jiné protein kinázu A (PKA), která fosforyluje hormon senzitivní lipázu (HSL) a ta se translokuje skrze fosfolipidovou monovrstvu do tukové kapénky. První krok hydrolýzy TAG je zprostředkován triacylglycerolovou lipázou tukové tkáně (ATGL - z angl. Adipose triglyceride lipase), která štěpí TAG na diacylglyceroly (Jenkins et al. 2004; Villena et al. 2004; Zimmermann et al. 2004).

ATGL je regulována prostřednictvím fosforylace AMPK, která tak stimuluje hydrolýzu TAG a zvyšuje míru lipolýzy. Ukázalo se, že velmi zásadní je role ATGL v BAT. Díky svému stimulačnímu účinku na lipolýzu je nepostradatelnou složkou netřesové termogeneze a významně se podílí na udržení fenotypu BAT. Během experimentu na myších, kterým byl v tukové tkáni vyřazen z funkce gen pro ATGL, se totiž zjistilo, že dochází ke snížení exprese genů typických pro BAT, jako je např. UCP1, a celkově dostává BAT charakter podobný spíše WAT (Ahmadian et al. 2011).



DAG jsou substrátem pro již zmiňovanou HSL, která je následně hydrolyzuje na monoacylglyceroly (MAG). HSL má poměrně nízkou specifitu a je tak schopna hydrolyzovat kromě DAG i TAG, MAG či cholesterolestery (Kraemer and Shen 2002; Fredrikson et al. 1981). Poslední hydrolytickou reakci zprostředkovává monoacylglycerolová lipáza (MGL), která štěpí MAG na glycerol a MK.

Osud uvolněných mastných kyselin v adipocyty může být dvojitý, buď jsou uvolňovány do krevního oběhu, kterým jsou dopravovány hlavně do jater, kde jsou využity pro tvorbu lipoproteinů bohatých na TAG, nebo jsou reesterifikovány a zůstávají v adipocytech deponované ve formě TAG (Voet and Voetova 1994) (Obr. 9).



**Obr. 9: Schéma lipolýzy v bílém adipocyty.**

Bližší popis v textu

AC - adenylát cykláza, PKA -protein kináza A, ATGL - triacylglycerolová lipáza tukové tkáně, HSL - hormon senzitivní lipáza, MGL - monoacylglycerolová lipáza, TAG - triacylglyceroly, DAG - diacylglyceroly, MAG - monoacylglyceroly, MK - mastné kyseliny, G-3-P - glycerol-3-fosfát, GLUT - glukózový transportér

(převzato z (Altarejos and Montminy 2011))

U již zmíněného proteinu perilipinu rozeznáváme dvě izoformy, perilipin A a perilipin B, přičemž obě tyto izoformy tvoří asi 0,25-0,5 % celkového počtu buněčných proteinů v adipocyty (Greenberg et al. 1991). Spolu s některými dalšími proteiny asociovanými s tukovou kapénkou je tzv. cílovým genem pro PPAR $\gamma$ , což znamená, že jeho exprese je jím přímo řízena (Dalen et al. 2004). Zjistilo se, že perilipin A zvyšuje ukládání TAG v adipocytech a naopak snižuje bazální lipolýzu, neboli jejich hydrolýzu. Principem této inhibice je pravděpodobně tvorba jakési bariéry na povrchu tukových

kapének, přičemž tato bariéra znemožňuje přístup lipázám, které TAG hydrolyzují (Brasaemle et al. 2000). Pozoruhodné je, že druhou velmi zásadní rolí, kterou perilipin zastává, je spolupodílení se na zvýšení lipolytické aktivity HSL na podnět katecholaminů (Miyoshi et al. 2006; Zhang et al. 2003). Perilipin je substrátem pro PKA, která perilipin fosforyluje a tím jej aktivuje. Zatímco některé studie poukazují na to, že fosforylovaný perilipin je nezbytný pro translokaci HSL z cytozolu do tukové kapénky (Sztalryd et al. 2003), jiné studie to vyvrací. V práci H. Miyoshiho a kol. se uvádí, že mechanismem, který je závislý na fosforylaci perilipinu prostřednictvím PKA, je např. lipolytické působení HSL asociované s tukovou kapénkou, nikoliv však její translokace (Miyoshi et al. 2006).

Narušení metabolismu lipidů v těle může vést k řadě metabolických komplikací, včetně kardiovaskulárních chorob.

### **3. Cíle práce**

Hlavním cílem této práce bylo charakterizovat vliv diety s vysokým obsahem tuku na experimentálních modelech myši kmene C57BL/6J a A/J a popsat funkci tukové tkáně u myši během časného postnatálního vývoje.

Specifické cíle:

#### **1. Charakterizovat a vyhodnotit vliv diety s vysokým obsahem tuku na:**

- tukovou tkáň (velikost zánětu)
- jaterní tkáň (obsah TAG)
- plazmatické hladiny leptinu a adiponektinu

#### **2. U mláďat v postnatálním vývoji:**

- Popsat a zdokumentovat funkční a morfologické změny v tukové tkáni
- Vyhodnotit vývoj plazmatických hladin dvou hlavních adipokinů, leptinu a adiponektinu
- Stanovit míru exprese mRNA leptinu ve čtyřech tkáních

## 4. Experimentální část

### 4.1. Pokusná zvířata

Pro experimenty byly použity laboratorní kmeny myši C57BL/6J (B6) se sklonem k rozvoji dietou indukované obezity a A/J (AJ), které jsou vůči obezitě naopak rezistentní. Myši byly chovány v kleci po jedné (Pokus č. 1), nebo v hnízdě s matkou (Pokus č. 2) v samostatných klecích v konvenčním zvěřinci Fyziologického ústavu AV ČR při 12 hodinovém umělém světelném režimu a při teplotě 22 °C.

### 4.2. Přehled pokusů

#### 4.2.1. Pokus č. 1

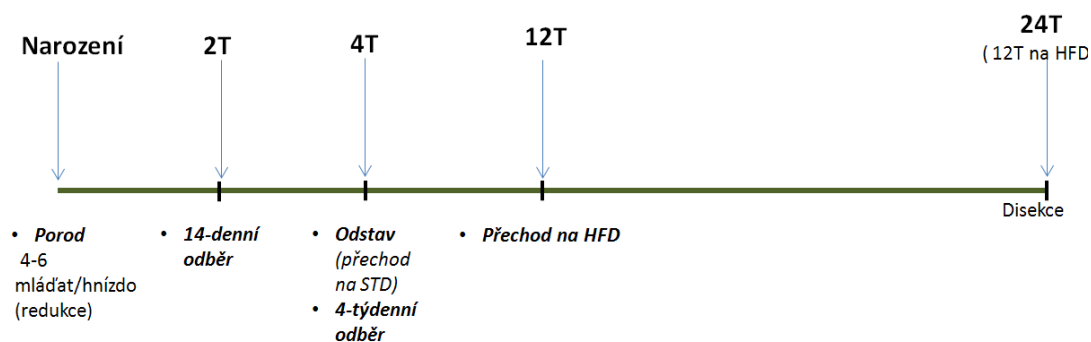
V pokusu č. 1 byly myši do odstavu (4. týden) příkrmovány standardní dietou určenou pro březí samice a mláďata (Ssniff EF M-Z control diet, Německo). Po odstavu jim byl podávána standardní dieta s nízkým obsahem tuku (STD; Ssniff EF R/M-H control diet, Německo) až do 12. týdne věku. Poté byly rozděleny do čtyř skupin, přičemž první dvě tvořili samci a samice kmene B6 (n=128), potažmo AJ (n=53), kterým byla indukována obezita podáváním diety s vysokým obsahem tuku (HFD) (Tab. 1). Zbýlé dvě skupiny byly kontrolními skupinami (B6, n=17; AJ, n=19) a byly až do konce experimentu krmeny STD. Všechna zvířata měla k oběma typům diet volný přístup po celou dobu experimentu. Ve 14. a 28. dnu po narození byl myším proveden odběr plazmy v nasyceném stavu. Ve 24. týdne věku po 12 týdnech na dietě byly myši v sytém stavu usmrceny cervikální dislokací při éterové narkóze. Odebrané vzorky tkání (játra a GON tukové depo) určené pro histologickou analýzu byly fixovány v 10% formaldehydu, plazma byla uchována při teplotě -80 °C.

- Složení diet

	<b>STD</b> (Ssniff EF M-Z control diet)	<b>STD</b> (Ssniff R/M-H)	<b>HFD</b>
Tuky (%)	4,5	3,4	35,2
Sacharidy (%)	41,0	42,2	35,4
Proteiny (%)	22,1	19,3	20,5
Energetická kapacita (kJ/g)	13,9	13,0	22,8

**Tab. 1: Podíl živin v jednotlivých dietách použitých v pokusu č. 1 a 2**

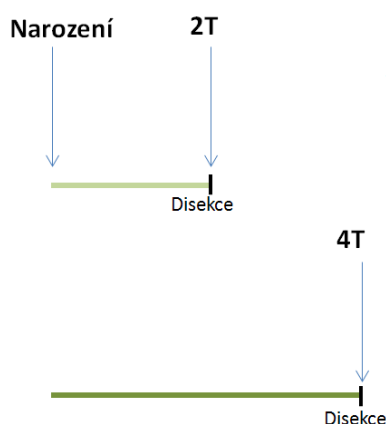
- Časová osa



#### 4.2.2. Pokus č. 2

V pokusu č. 2 se porovnávaly rovněž 2 kmeny myši B6 a AJ a 2 věkové skupiny 2 a 4 týdny (2T, 4T), celkově tedy 4 skupiny po 12 jedincích z toho 6 samců a 6 samic. Myši byly kojeny a od přechodu na pevnou stravu (~ 14. den) příkrmovány STD pro březí samice a mláďata (Ssnif EF M-Z control diet, Německo) (viz. Tab. 1 v předchozí kapitole). Usmrceny byly cervikální dislokací při éterové narkóze a během pitvy byly odebrány tkáně pro další analýzy (DL tukové depo, GON tukové depo, BAT, žaludek). GON a DL tukové depo určené pro histologickou analýzu bylo fixováno v 10% formaldehydu, zbytek tkání byl zmražen v tekutém dusíku.

- Časová osa



#### 4.3. Histologie

Za účelem histologické analýzy byly odebrané vzorky nejprve dehydratovány ve vzestupné alkoholové řadě, zality do parafínu a následně nařezány na řezy o tloušťce 3  $\mu\text{m}$  na přístroji Microtom Leica RM2235 (Leica Biosystems, ČR).

#### 4.3.1. Barvení hematoxylinem a eosinem

Barvení hematoxylinem a eosinem je založené na rozdílných fyzikálně-chemických vlastnostech jednotlivých buněčných komponent. Hematoxylin je bazické barvivo vážící se na acidické složky (např. jádro). Naproti tomu eosin interaguje se strukturami, které mají vysokou afinitu k látkám zásaditého charakteru (např. mitochondrie, cytoplazma).

Roztoky:

xylen .....	Penta, ČR
96% etanol .....	Penta, ČR
75% etanol .....	Penta, ČR
50% etanol .....	Penta, ČR
hematoxylin (Haematoxylin solution Gill III) .....	Merck KGaA, Německo
eosin (Eosin-Y aqueous solution 0,5%) .....	Merck KGaA, Německo
montovací médium (Eukitt quick-hardening mounting medium) .....	Merck KGaA, Německo

Řezy byly nejprve deparafinovány a hydratovány v sestupné alkoholové řadě (xylen -> 96% -> 75% -> 50% etanol). Poté byly inkubovány po dobu 5 min s hematoxylinem. Délka inkubace s eosinem závisela na typu tkáně (játra 1 min, BAT 5 min, GON 10 min). Následoval oplach kohoutkovou vodou po dobu 1 min. Na závěr byly vzorky zpětně dehydratovány ve vzestupné alkoholové řadě (50% -> 75% -> 96% etanol), usušeny v termostatu při 37 °C (přibližně 30 min) a zamontovány. Digitální snímky byly pořízeny na světelném mikroskopu Olympus AX70 záznamovým zařízením DP 70 (Olympus, Tokyo, Japonsko).

#### 4.3.2. Barvení kryořezů jaterní tkáně olejovou červení

Přístroje a materiál:

kryotom Leica cm 1850 .....	Leica Biosystems, ČR
-----------------------------	----------------------

Roztoky:

10% formalin .....	Penta, ČR
--------------------	-----------

50% etanol .....	Penta, ČR
olejová červeň - roztok v 70% etanolu .....	Fluka, USA
hematoxylin (Haematoxylin solution Gill III) .....	Merck KGaA, Německo
vodorozpustné montovací médium .....	Serotec, USA

Tento typ barvení slouží k detekci lipidů. Využívá se zde lepší rozpustnosti olejové červeně v lipidech než v běžných rozpouštědlech. Pro správnou penetraci barviva dovnitř tukových kapének je vhodné, aby bylo předem rozpuštěno v organickém rozpouštědle, v našem příp. v 70% etanolu.

Vzorky jaterní tkáně byly nařezány na kryotomu (-19 °C) na řezy o tloušťce 10 µm a poté se barvily olejovou červení. Nejprve byly inkubovány 60 min v 10% formalinu a po dobu dalších 10 min v 50% etanolu. Následně byly 15 min inkubovány s olejovou červení rozpuštěnou v 70% etanolu. V dalším kroku byla zopakována inkubace s 50% etanolem, následovaná promýváním vzorků v destilované vodě po dobu 5 min. Pro zviditelnění jader se provedla krátká inkubace (1 min) s hematoxylinem. Nakonec byly vzorky zamontovány do vodorozpustného média. Digitální snímky byly pořízeny na světelném mikroskopu Olympus AX70 záznamovým zařízením DP 70 (Olympus, Tokyo, Japonsko).

#### **4.3.3. Imunohistochemická barvení**

K imunohistochemickým barvením byla využita tzv. nepřímá trojstupňová metoda. Jejím principem je navázání primární protilátky k antigenu v prvním kroku a následná reakce enzymově značené (v našem příp. biotinylované) sekundární protilátky s primární v kroku druhém. Další složkou přidávanou do reakce je tzv. avidin-biotin komplex (ABC kit). Avidin disponuje čtyřmi vazebnými místy pro biotin, přičemž některá tato místa jsou volná pro interakci s biotinylovanou sekundární protilátkou, některá jsou obsazena komplexem biotin-peroxidáza. Enzymatická aktivita peroxidázy způsobuje oxidaci chromogenu 3,3'-diaminobenzidinu (DAB), jejímž výsledkem je hnědé zabarvení, které je indikátorem přítomnosti specifické reakce v místě struktury, proti které je vyvinutá primární protilátka.

#### 4.3.3.1. Barvení protilátkou proti MAC2 (Galektin-3)

Materiál:

inkubační box se zvýšenou vlhkostí

třepačka WT12 ..... Biometra, Německo

Roztoky:

xylen ..... Penta, ČR

96% etanol ..... Penta, ČR

75% etanol ..... Penta, ČR

50% etanol ..... Penta, ČR

hematoxylin (Haematoxylin solution Gill III) ..... Merck KGaA, Německo

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ..... Penta, ČR

100% metanol ..... Penta, ČR

PBS (pH=7,4): NaCl ..... Merck KGaA, Německo

KCl..... Merck KGaA, Německo

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... Merck KGaA, Německo

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... Merck KGaA, Německo

normální koňské sérum ..... Vector, USA

monoklonální primární protilátka proti myšimu Mac-2/galectin-3 Cedarlane, Kanada

biotinylovaná sekundární protilátka proti myšimu IgG ..... Vector, USA

ABC kit ..... Vector, USA

DAB (3,3'-diaminobenzidin) tablety ..... Merck KGaA,  
Německo

montovací médium (Eukitt quick-hardening mounting medium) Merck KGaA,  
Německo

Galektin-3, neboli MAC2, je označení pro skupinu proteinů vázajících cukry, které jsou hojně exprimovány mj. v aktivovaných makrofázích. Protilátka byla vyvinuta ke zviditelnění CLS tvořených makrofágy v tukové tkáni.

Nejprve byla u všech vzorků provedena deparafinace inkubací v sestupné alkoholové řadě (xylen -> 96% -> 75% -> 50% etanol) a oplach ve vodě. Následnou inkubací s 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v metanolu po dobu 30 min došlo k blokaci endogenní aktivity peroxidáz v tkáni, které by mohly zkreslovat výsledek barvení. Vzorky se dále opláchly



2x po 15 min ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem (PBS). Pro blokaci nespecifických vazeb primární a sekundární protilátky byl použit roztok koňského séra v ředění 1:50, se kterým se vzorky inkubovaly 30 min v inkubačním boxu se zvýšenou vlhkostí. V dalším kroku byla ke všem vzorkům, vyjma negativních kontrol, přidána primární monoklonální protilátka v koncentraci 1:3500 ředěná PBS. Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc ve 4 °C.

Druhý den se vzorky nejprve opláchly 2x 15 min v PBS. Po přidání sekundární biotinylované protilátky v ředění 1:200 probíhala inkubace 30 min v inkubačním boxu. V dalším kroku se opakoval 2x oplach v PBS. Mezitím byl připraven ABC kit. Inkubace s ABC kitem probíhala rovněž 30 min v inkubační boxu. Znovu byl proveden oplach 2x 15 min v PBS. Následně byl ke vzorkům přidán DAB rozpuštěný ve 2,5 ml H<sub>2</sub>O, se kterým se vzorky inkubovaly 2 min. Po oplachu v kohoutkové vodě byly vzorky inkubovány 1 min v hematoxylinu pro obarvení jader. Následoval opět oplach pod kohoutkovou vodou po dobu 1 min a inkubace ve vzestupné alkoholové řadě (50% -> 75% -> 96% etanol), sušení v termostatu (37 °C, 30 min) a zamontování. Digitální snímky byly pořízeny na světelném mikroskopu Olympus AX70 záznamovým zařízením DP 70 (Olympus, Tokyo, Japonsko).

#### 4.3.3.2. Barvení protilátkou proti UCPI

Přístroje a materiál:

inkubační box se zvýšenou vlhkostí

třepačka WT12 ..... Biometra, Německo

Roztoky:

xylen ..... Penta, ČR

96% etanol ..... Penta, ČR

75% etanol ..... Penta, ČR

50% etanol ..... Penta, ČR

hematoxylin ..... Dako, Německo

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ..... Penta, ČR

100% metanol ..... Penta, ČR

PBS (pH=7,4): NaCl ..... Merck KGaA, Německo

KCl.....	Merck KGaA, Německo
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	Merck KGaA, Německo
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	Merck KGaA, Německo
citrátový pufr (pH=6), 10x .....	Merck KGaA, Německo
0,05% Tween .....	Serva, Německo
kozí sérum .....	Vector, USA
primární protilátka C4/98, vyvinutá v králíkovi proti myšímu proteinu (Pavel Flachs, 1998)	
biotinylovaná sekundární protilátka proti králíčímu IgG .....	Vector, USA
ABC kit .....	Vector, USA
DAB (3,3'-diaminobenzidin) tablety.....	Merck KGaA, Německo
montovací médium (Eukitt quick-hardening mounting medium)	Merck KGaA, Německo

Všechny vzorky byly nejprve deparafinovány v sestupné alkoholové řadě (xylen - > 96% -> 75% -> 50% etanol) a promyty pod kohoutkovou vodou. Následně se vzorky inklubovaly v citrátovém pufru, 2x 15 min při 95 °C. Po vychladnutí (přibližně 20 min) se 2x promyly ve vodě a nechaly inkubovat s 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v metanolu po dobu 10 min. V dalším kroku se vzorky opláchly 20 min v PBS s přidaným 0,05% Tween, který umožňuje prostup protilátky do mitochondrií, a poté 15 min v samotném PBS. Ke všem vzorkům bylo přidáno 10% kozí sérum pro blokaci nespecifické vazby primární a sekundární protilátky. Po 30 min inkubace byla k vzorkům bez předchozího oplachu přidána primární protilátka C4/98 ředěná PBS (s 1% kozím sérem) v koncentraci 1:4000. Inkubace probíhala přes noc při 4 °C.

Druhý den se vzorky opláchly 2x 15 min v PBS a posléze k nim byla přidána biotinylovaná sekundární protilátka v ředění 1:200. Po 1 hod inkubace se vzorky opět opláchly v PBS 2x 15 min. Mezitím byl připraven ABC kit, se kterým byly vzorky inkubovány po vyjmutí z PBS po dobu 1 hod. Poté se opakoval krok oplachu v PBS 2x po 15 min. V dalším kroku byl na vzorky nanesen DAB rozpuštěný ve 2,5 ml H<sub>2</sub>O a po 2 min inkubace byl odmyt kohoutkovou vodou. Pro obarvení jader byly vzorky inkubovány 1 min v hematoxylinu a poté promyty pod tekoucí vodou. Vzorky byly nakonec odvodněny ve vzestupné alkoholové řadě (50%->75%->96% etanol), usušeny

v termostatu (37 °C, 30 min) a zamontovány. Digitální snímky byly pořízeny na světelném mikroskopu Olympus AX70 záznamovým zařízením DP 70 (Olympus, Tokyo, Japonsko).

#### 4.4. Stanovení koncentrace triacylglycerolů ve vzorcích jaterní tkáně

Přístroje a materiál:

vortex .....	Scientific Industries, USA
minicentrifuga .....	Labnet, USA
termoblok .....	Biometra, Německo
třepačka WT12 .....	Biometra, Německo
spektrofotometr Sunrise basic Tecan.....	Tecan, Švýcarsko
multikanálová pipeta .....	Gilson, Francie

Roztoky:

3M KOH .....	Penta, ČR
65% etanol .....	Penta, ČR
Reakční činidlo TG 250 .....	Erba Lachema, ČR

Předem zvážená jaterní tkáň uchovávaná v -80 °C byla z mrazícího boxu přenesena do tekutého dusíku pro usnadnění další manipulace. K vzorkům bylo do 2ml mikrozkušavek připipetováno 150 µl KOH rozpuštěného v 65% etanolu, mikrozkušavky se následně důkladně zajistily čepičkami a promíchaly na vortexu. Vzorky se v KOH rozpouštěly v termobloku po dobu 2 hod při 70 °C. Po uplynutí přibližně jedné hodiny se promíchaly a krátce stočily na minicentrifuze. Totéž se provedlo i na konci rozpouštění. Do nových 1,5ml mikrozkušavek se odebralo 50 µl vzorku, přidalo se 450 µl H<sub>2</sub>O a opět se vše stočilo na minicentrifuze.

Do 96-ti jamkové destičky bylo napipetováno:

2x BLANK - 3 µl H<sub>2</sub>O na začátek a na konec

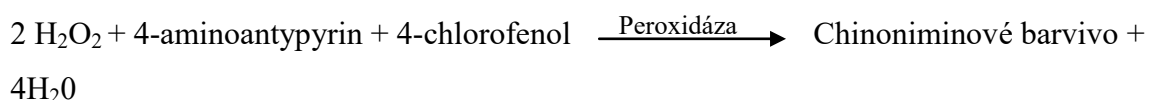
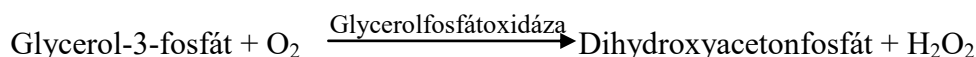
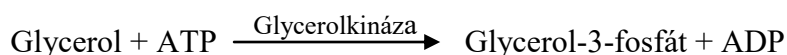
2x STANDARD - 3 µl na začátek a na konec

VZORKY - 3 µl (pod sebe) v dupletech

Ke všem vzorkům bylo po stěnách přidáno 300 µl reakčního činidla. Destička se nechala inkubovat 10 min při 37 °C v termostatu na třepačce.

Měření a vyhodnocení bylo provedeno na spektrofotometru v programu MAGELLAN při vlnové délce 546 nm.

Koncentrace TAG v tkáni se určuje na základě změřené absorbance barviva, které je výsledkem po sobě jdoucích enzymatických reakcí (viz. níže). Velikost absorbance je přímo úměrná množství glycerolu, který vzniká hydrolýzou TAG během inkubace s 3M KOH v 65% etanolu.



Výpočet:

$$A_{\text{vz}} - A_{\text{bl}} = A_1$$

$$A_{\text{st}} - A_{\text{bl}} = A_2$$

$$V \times A_1 / A_2 = C_{\text{vz}}$$

$A_{\text{vz}}$  - naměřená absorbance vzorku

$A_{\text{bl}}$  - průměrná absorbance blanku

$A_{\text{st}}$  - naměřená absorbance standardů

$A_2$  - průměrná absorbance standardního vzorku

$V$  - množství TAG

#### 4.5. Izolace RNA

Přístroje a materiál:

Oscilační mlýn Mill MM400 .....	Retsch, Německo
Homogenizátor Ultra-turrax T8.01 .....	IKA, Německo
centrifuga Universal 320 R .....	Hettich, Německo
vortex .....	Scientific Industries, USA
vakuová sušička VR-1 Heto .....	Thermo Scientific, USA
termoblok .....	Biometra, Německo
minicentrifuga .....	Labnet, USA
spektrofotometr NanoDrop.....	NanoDrop, USA
pipety .....	Gilson, Francie

Roztoky:

TRIzol .....	Merck KGaA, Německo
--------------	---------------------

chloroform .....	Penta, ČR
izopropanol .....	Serva, Německo
75% etanol .....	Penta, ČR

RNA byla izolována ze 4 tkání: žaludku, BAT, DL a GON tukového depa. Izolace probíhala při pokojové teplotě a za použití pipet a chemikálií speciálně tomu určených.

Zmražené vzorky byly přeneseny do čistých mikrozkušavek a ke každému z nich byl přidán 1 ml TRIzol. Homogenizace probíhala v oscilačním mlýnu po dobu 3 min na max. frekvenci. V případě žaludku bylo pro homogenizaci nutné použít Ultraturrax. Vzorky tkání byly následně stočeny na centrifuze při 12 000 g, 4 °C na 10 min. Po stočení byl odebrán do čisté mikrozkušavky přibližně 1 ml z vrstvy mezi horní vrstvou tvořenou tukem a spodní obsahující pelet. Homogenát se inkuboval 5 min při pokojové teplotě.

V dalším kroku bylo ke vzorkům přidáno 200 µl chloroformu a vše bylo řádně promícháno. Vzorky se nechaly inkubovat po dobu 10 min a následně se stočily na centrifuze při 14 000g, 4 °C na 15 min. Po oddělení jednotlivých fází bylo velmi opatrně odebráno do nové čisté mikrozkušavky přibližně 400 µl z horní vrstvy.

K vysrážení RNA bylo použito 500 µl izopropanolu, se kterým se vzorky po protřepání nechaly inkubovat 10 min. Následovala centrifugace při 12 000 g, 4 °C po dobu 10 min. Po tomto kroku se na dně mikrozkušavky vysrážel zřetelný precipitát. Odebral se supernatant a přidal se 1 ml 75% etanolu do každé z mikrozkušavek. Vzorky se promíchaly na vortexu a nechaly po dobu 5 min inkubovat. Nakonec se stočily při 12 000 g, 4 °C na 5 min. Byl odebrán supernatant (do sucha) a pro dokonalé vysušení byly vzorky ještě 5 min vysušeny při 40 °C pod vakuem.

Pelety byly rozpuštěny ve vodě v termobloku při 60 °C po dobu 15 min, přičemž každých 5 min byly promíchány na vortexu. Přidávaný objem vody byl pro každou tkáň odlišný:

- BAT ..... 30 µl
- DL tukové depo..... 11 µl
- GON tukové depo ..... 11 µl
- ŽAL ..... 200 µl

Před měřením koncentrace RNA na přístroji NanoDrop byly všechny vzorky důkladně promíchány a stočeny na minicentrifuze.

#### 4.6. Nativní elektroforéza na agarovém gelu

Přístroje a materiál:

elektroforetický aparát ..... Cleaver Scientific Ltd, UK  
UV transiluminátor ..... Ultra-Lum Inc., USA

Roztoky:

agaróza ..... Serva, Německo  
TBE pufr ..... Merck KGaA, Německo  
GelRed ..... Biotium Inc, USA  
Gel Loading blue ..... New England BioLabs,  
USA

Pro RNA izolovanou ze žaludku byla provedena kontrola její integrity prostřednictvím nativní elektroforézy. Tato metoda funguje na principu pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Během reakce není použito žádných denaturačních činidel, díky čemuž se fragmenty nukleových kyselin v gelu separují podle své velikosti a konformace.

Po izolaci celkové RNA byl do nové mikrozkuřavky odebrán objem odpovídající přibližně 1 µg RNA. Vzorky byly naředěny redestilovanou vodou tak, aby byl výsledný objem 8 µl. V Erlenove baňce byl rozpuštěn 1 g agarózy v 50 ml 0,5% TBE pufru, aby po následném zahřátí roztoku v mikrovlnné troubě vznikl 2% agarózový gel. Do rozpuštěné agarózy bylo po zchladnutí na teplotu přibližně 60 °C přidáno 5 µl fluorescenčního barviva GelRed.

Gel po nalití do vaničky tuhnul 30 min při pokojové teplotě. Mezitím byly ke každému vzorku přidány 2 µl GEL Loading blue, vzorky byly následně promíchány na vortexu a stočeny na minicentrifuze. Po ztuhnutí byl gel zalit 0,5% TBE puforem tak, aby byl celý pod hladinou. Do každé z jamek byl nanesen objem 5 µl vzorku. Poté se elektroforetický aparát připojil ke zdroji a reakce běžela přibližně 90 min při 60 V.

Po doběhnutí byl gel vyndán z vaničky a analyzován pod UV. Pomocí záznamového zařízení byly pořízeny snímky.

#### 4.7. Reverzní transkripce

Přístroje a materiál:

vortex ..... Scientific Industries, USA  
minicentrifuga ..... Labnet, USA  
termocyklér/přístroj na reverzní transkripci ..... Biometra, Německo  
pipety ..... Gilson, Francie

Roztoky:

oligo thymidin ..... Generi Biotech, ČR  
5x pufr pro reverzní transkripci ..... Invitrogen, Německo  
dNTP ..... Invitrogen, Německo  
DTT ..... Invitrogen, Německo  
M-MLV reverzní transkriptáza ..... Invitrogen, Německo

Reverzní transkripce je proces, během kterého dochází k přepisu genetické informace z molekuly RNA do molekuly cDNA za použití virového enzymu, reverzní transkriptázy. Výsledkem je hybridní molekula RNA-DNA.

Izolovaná RNA byla na začátku rozmražena a naředěna na koncentraci odpovídající přibližně 1 µg/µl. V případech, kdy byla koncentrace naizolované RNA nižší než 1 µg/µl, se naředila na 0,5 µg/µl, případně na 0,25 µg/µl a do reakce bylo odebráno takové množství, které odpovídalo 1 µg RNA. Všechny úkony byly prováděny na ledu, nebo na vychlazeném bločku. V UV-dekontaminačním boxu byly připraveny různé mixy A pro všechny koncentrace (viz tab.). Mix A je roztok redistilované vody a oligo T, který je komplementární ke koncovému polyA řetězci mRNA. Po nasednutí na jednovláknovou RNA slouží jako primer pro reverzní transkriptázu, která přepíše řetězec mRNA do molekuly cDNA.

Vzorky po smíchání s příslušným mixem A byly řádně promíchány, stočeny na minicentrifuze a dány do termocykléru. V prvním kroku byla přítomná RNA denaturována při 65 °C po dobu 5 min. V tomto mezičase byl v UV-dekontaminačním

boxu připraven mix B smícháním níže uvedených složek (Tab. 2). Po denaturaci byly všechny vzorky přendány na vychlazený bloček a ke každému z nich bylo připipetováno 8 µl namíchaného mixu B. Vzorky byly vráceny zpět do přístroje a reakce pokračovala fází, při které docházelo k syntéze komplementárního vlákna cDNA přiřazováním patřičných dNTP. Syntéza probíhala při 37 °C po dobu 50 min. Závěrečnými fázemi byla fáze denaturace při 72 °C po dobu 10 min následovaná zchlazením vzorků na 4 °C.

Na závěr byla získaná cDNA pro účely qPCR reakce 20x naředěna a uložena do -20 °C.

<b>MIX A</b>	<b>[µl/1 vzorek/c<sub>RNA</sub>1]</b>
Redes. H <sub>2</sub> O	0,5
Oligo T	8,0
<b>MIX B</b>	<b>[µl/1 vzorek]</b>
5x pufr pro reverzní transkripci	4,0
DTT	2,0
dNTP mix	1,0
M-MLV reverzní transkriptáza	1,0

**Tab. 2: Složení mixu A a B pro reverzní transkripci**

#### 4.8. Kvantitativní PCR (qPCR)

Přístroje a materiál:

vortex ..... Scientific Industries, USA  
minicentrifuga ..... Labnet, USA  
multikanálová pipeta ..... Gilson, Francie  
LightCycler® 480 Real-time PCR Systém ..... Roche, Německo

Roztoky:

LightCycler® 480 SyberGreen I Master ..... Roche, Německo  
primery ..... Generi Biotech, ČR

Pro kvantitativní PCR reakci byl jako fluorescenční substrát použit SybrGreen. SybrGreen je interkalační činidlo vážící se do dvouvláknové DNA. Během této reakce je v každém cyklu emitována fluorescence, která je přímo úměrná množství



amplifikované DNA. Primery pro tuto reakci byly navrženy v softwaru Lasergene 7.1 (DNA Star). Výčet použitých primerů je uveden níže (Tab. 3):

Gen	Kód GenBank	Sekvence	Délka produktu [bp]	Teplota nasedání [°C]
18S RNA	19791	5'GCCCCGAGCCGCTGGATAC 5'CCGGCGGGTCATGGGAATAAC	299	60,6
Hprt	15452	5'GGATACAGGCCAGACTTTG 5'GCAGATGGCCACAGGACTA	230	52,2
Leptin	16846	5'CCGCCAAGCAGAGGGTCAC 5'GCATTCAGGGCTAACATCCAAC	347	60,0

**Tab. 3: Seznam použitých primerů**

V UV-dekontaminačním boxu byl do 1,5ml mikrozkušavky připraven Master mix smícháním níže uvedených složek (Tab. 4):

Master mix	[μl/1 vzorek]
2x SybrGreen	5,0
Redes. H <sub>2</sub> O	3,0
3' primer (10x koncentrovaný)	0,5
5' primer (10x koncentrovaný)	0,5

**Tab. 4: Složení reakční směsi (Master mix) pro qPCR reakci**

Master mix byl následně řádně promíchán na vortexu, stočen a rozpipetován po 9 μl do 96-ti jamkové destičky. Do každé z jamek byl přidán 1 μl vzorku, předem zvortexovaný a stočený, a nanášel se vždy v dupletech. Po celou dobu manipulace byly vzorky uchovávány na vychlazeném bločku. Měření probíhalo v několika fázích (viz. Tab. 5) v přístroji LightCycler® 480 Real-time PCR Systém od firmy Roche.

	Cílová teplota [°C]	Doba udržování teploty [s]	Rychlost změny teploty [°C/s]
Počáteční denaturace	95	360	4,4
Amplifikace			
Denaturace	95	10	4,4
Nasedání primerů			
18S RNA	61	10	2,2
Hprt	52	10	2,2
Leptin	60	10	2,2
Elongace	72	10	4,4
Denaturační analýza			
Denaturace	95	5	4,4
Renaturace	65	60	2,2
Postupná denaturace	97	-	-
Zchlazení	40	10	2,2

**Tab. 5: Reakční fáze qPCR reakce**

Z naměřených hodnot vzorku nanášeného v dupletech byl vypočítán průměr. Pro stanovení exprese genu pro jednotlivé vzorky, byla sestavena kalibrační přímka, kterou tvořily hodnoty exprese genu ve standardu, ředěném v koncentraci 10x, 20x, 40x a 80x. Za správnou se považuje kalibrační křivka, jejíž sklon je v rozmezí -3,58 až -3,10. Aby se mezi sebou mohly vzorky porovnat a zároveň není možné zajistit srovnatelné množství vstupní cDNA, bylo nutné změřit navíc expresi genu, která se očekává stejná u všech vzorků, tzv. gen referenční či "house-keeping gen". V tomto experimentu byly jako referenční geny použity 18S RNA a Hprt (hypoxantin-guanin fosforibosyl transferáza). Z hodnot naměřených pro referenční geny byl vypočítán geometrický průměr a jím se pak podělily výsledky měření genu, který nás zajímal. Tímto jsme získali standardizované výsledky exprese genů.

Pro to, aby bylo možné porovnat genovou expresi mezi jednotlivými tkáněmi, bylo nutné provést relativní kvantifikaci metodou  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak and Schmittgen 2001).

#### 4.9. Statistické vyhodnocení dat

Data byla statisticky vyhodnocena v programu SigmaStat 4.0 (Systat Software, USA). Pro data s normálním rozložením byla použita jednocestná ANOVA s Holm-Sidak post-hoc testem. Hladina statistické významnosti byla stanovena na  $P < 0,05$ .

Výsledky jsou udávány jako průměrné hodnoty a odchylky jsou vyjádřeny jako střední chyby výběrového průměru (SE). Korelační analýzy byly provedeny v programu JMP (SAS, USA) a pro měření závislosti byl použit Spearmanův korelační koeficient.

---

#### **Stanovení koncentrace leptinu a adiponektinu v plazmě metodou BioPlex (prováděla Mgr. Jana Hansíková)**

##### **Příprava vzorků a imunoprecipitace**

Vzorky myší plazmy byly naředěny 1:4 ve vzorkovém pufru, krátce zvortexovány a stočeny. Magnetické kuličky s kovalentně navázanou protilátkou byly 20x naředěny v reakčním pufru a do každé jamky bylo přidáno 50 µl této směsi. Ke kuličkám bylo do každé jamky přidáno 50 µl vzorku. Následně byla vytvořena kalibrační řada naředěním dodávaného standardu. Destička byla zakryta alobalem a vzorky se nechaly inkubovat 1 hod na třepačce (850 rpm).

##### **Značení a detekce**

Destička byla 3x automaticky promyta 100 µl promývacího pufru pomocí automatického přístroje (Bio-Plex Pro™ Wash Station). Detekční biotinylovaná protilátka byla 20x ředěna a přidána do každé jamky v objemu 25 µl. Poté následovala inkubace po dobu 30 min při 850 rpm a poté byla znovu destička 3x promyta. Ke kuličkám bylo přidáno 50 µl konjugátu streptavidin-fykoerythrin. Během 10 minutové inkubace se streptavidin navázal na detekční protilátku. Fykoerythrin slouží jako fluorescenční značení. Intenzita fluorescence v jednotlivých vzorcích byla detekována pomocí přístroje BioPlex200 system (Bio-Rad, Veenendaal, The Netherlands).

##### **Vyhodnocení**

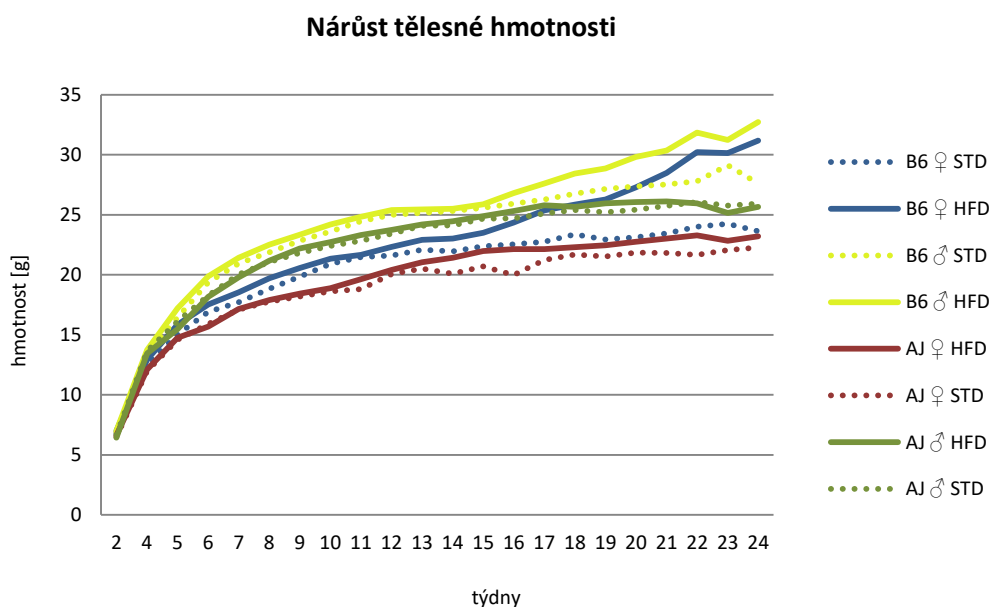
Vyhodnocení a výpočty koncentrace leptinu byly provedeny softwarem Bio-Plex Manager 5.0. Koncentrace leptinu ve vzorku byla vypočtena podle kalibrační křivky v jednotkách pg/ml.

## 5. Výsledky

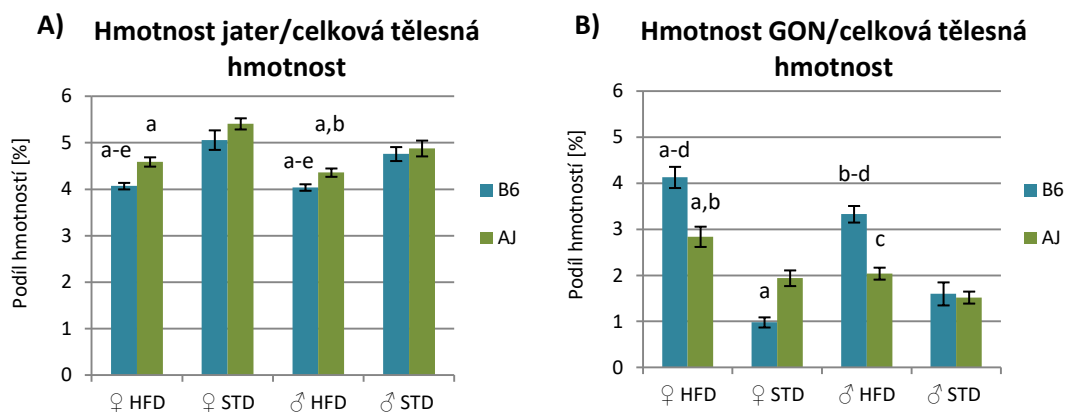
### 5.1. Porovnání vlivu HFD na jaterní a tukovou tkáň u kmenů C57BL/6J a A/J

V rámci pokusu č. 1 byly porovnávány obě pohlaví dvou myších kmenů C57BL/6J (B6) a A/J (AJ), kterým byla od 12. týdne podávána experimentální HFD/STD po dobu 12 týdnů (viz. kapitola 4.2.1.). První dva odběry byly provedeny 14. a 28. den života, při kterých byla myším odebrána krevní plazma v systém stavu. K usmrcení a odběru tkání k histologické a biochemické analýze (plazma, játra, GON tukové depo) došlo ve 24. týdnu věku (24T).

Nárůst tělesné hmotnosti během pokusu je zaznamenán v grafu 1. Je zde zřetelný vyšší nárůst hmotnosti obou pohlaví myši kmene B6 na HFD proti myším na STD. U myši kmene AJ HFD nezpůsobila signifikantní nárůst hmotnosti oproti kontrolám na STD. Podíl hmotnosti jater na celkové tělesné hmotnosti ve 24T byl signifikantně nižší u obou kmenů na HFD v porovnání se zvířaty na STD (B6  $P < 0,05$ ; AJ  $P < 0,001$ ; Graf 2A), přičemž nebyly pozorovány mezipohlavní rozdíly. Procentuální zastoupení hmotnosti GON v těle bylo naopak signifikantně nižší u všech skupin myší, mimo samice (♀) kmene AJ, na STD v porovnání s myši na HFD (B6  $P < 0,001$ ; AJ  $P < 0,05$ ; Graf 2B).



**Graf 1:** Průběh nárůstu tělesné hmotnosti.

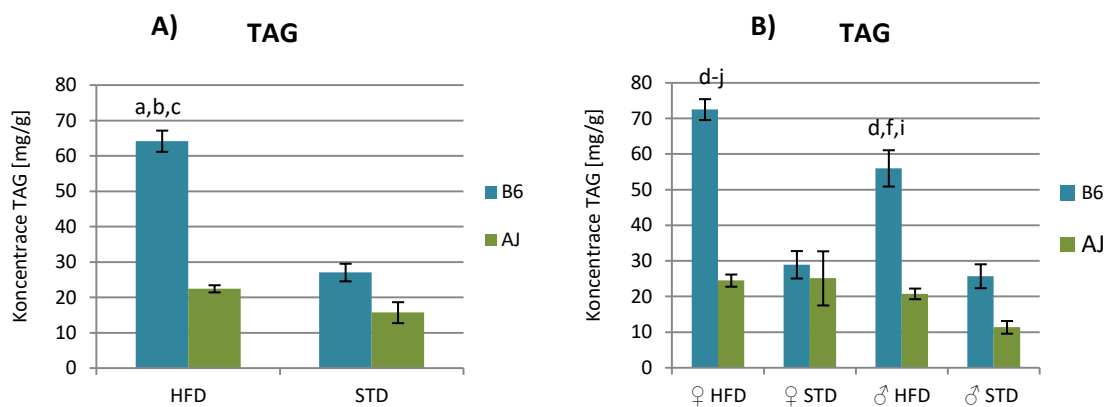


**Graf 2: Podíl hmotnosti jater (A) a GON tukového depa (B) na celkové tělesné hmotnosti.** Signifikantní rozdíl v porovnání s <sup>a</sup>AJ ♀ STD, <sup>b</sup>B6 ♀ STD, <sup>c</sup>AJ ♂ STD, <sup>d</sup>B6 ♂ STD, <sup>e</sup>AJ ♀ HFD ( $P < 0,05$ ; jednocestná ANOVA).

**Závěr:** Celková tělesná hmotnost se lišila u myši kmene B6 na HFD a STD a dále mezi kmeny B6 a AJ. Myši na HFD měly oproti kontrolním zvířatům krmeným STD s nízkým obsahem tuku signifikantně nižší procentuální podíl hmotnosti jater a naopak vyšší podíl GON na celkové hmotnosti.

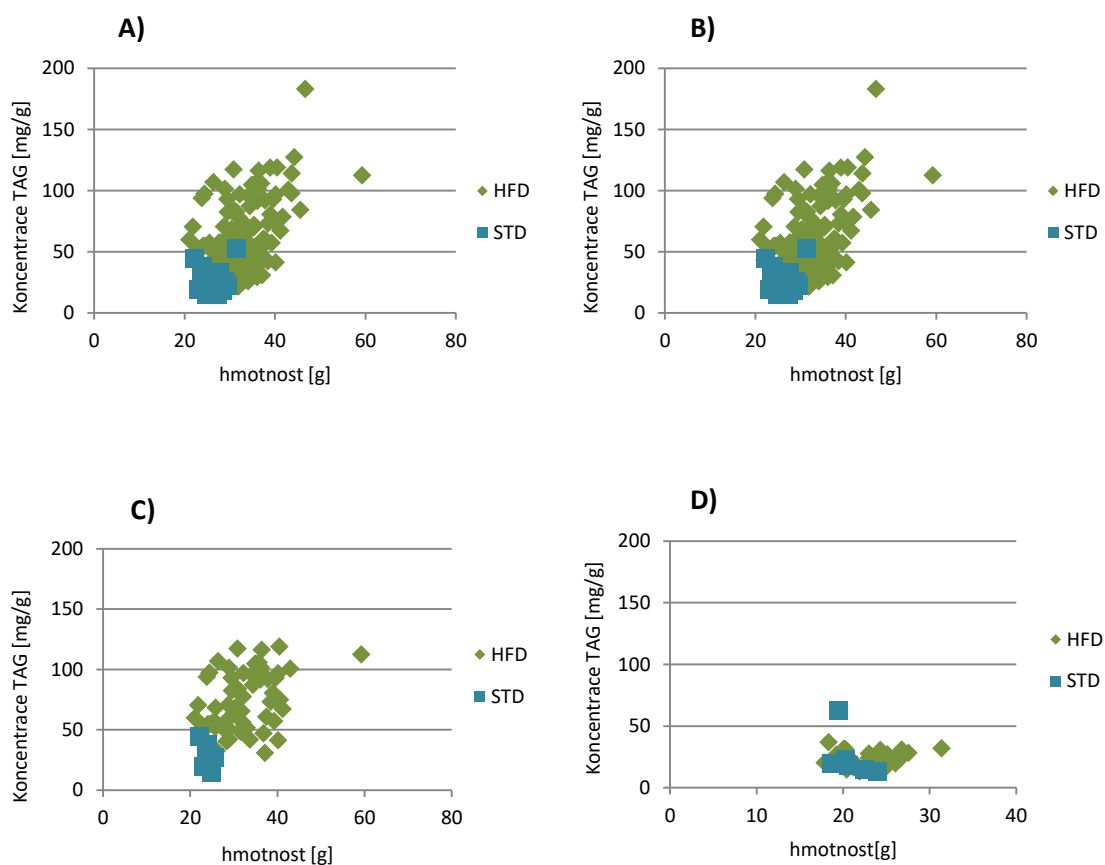
### 5.1.1. Stanovení koncentrace TAG v játrech

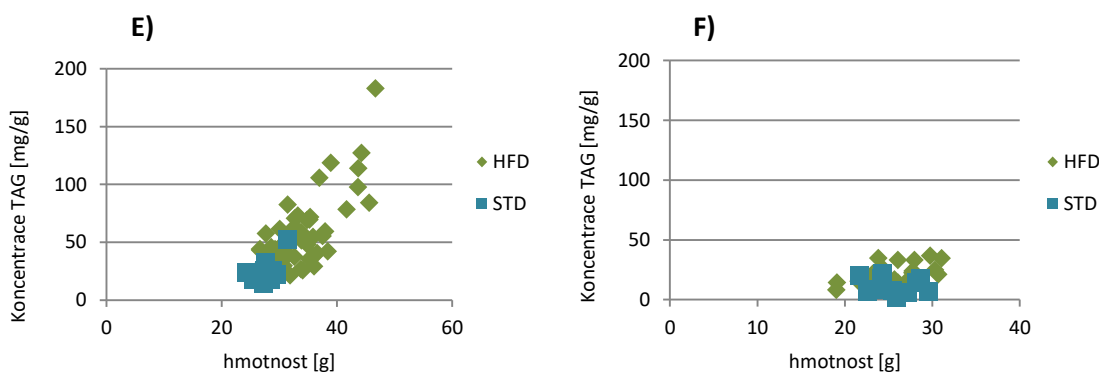
Během pitvy byla pro biochemickou analýzu odebrána z jater část označovaná jako lobus dexter. V něm byl stanoven obsah TAG v jednotkách mg/g tkáně. U myši na HFD bylo naměřeno signifikantně vyšší množství TAG u kmene B6 než AJ ( $P < 0,001$ ; Graf 3A). U kmene B6 byl navíc prokázán statisticky významný rozdíl mezi zvířaty na HFD a STD ( $B6\ STD < B6\ HFD$ ;  $P < 0,001$ ). Ve všech případech měly oba kmeny tendenci vykazovat vyšší množství TAG u ♀ než u samců (♂), ale pouze u kmene B6 na HFD vyšel tento rozdíl signifikantně ( $P < 0,05$ ; Graf 3B). Koncentrace TAG v játrech byla následně vynesena také jako závislost na celkové tělesné hmotnosti (Graf 4). Korelace mezi koncentrací TAG a celkovou hmotností byla prokázána pouze u ♂ kmene B6 ( $r_s = 0,621$ ;  $P < 0,0001$ ; Graf 4E).



**Graf 3: Koncentrace TAG v játrech myši kmene B6 a AJ (A), ♂ a ♀ (B).** Signifikantní rozdíl ve srovnání s <sup>a</sup>AJ STD, <sup>b</sup>B6 STD, <sup>c</sup>AJ HFD ( $P < 0,001$ ), <sup>d</sup>AJ ♂ STD, <sup>e</sup>AJ ♀ STD, <sup>f</sup>B6 ♂ STD, <sup>g</sup>B6 ♀ STD, <sup>h</sup>AJ ♀ HFD, <sup>i</sup>AJ ♂ HFD, <sup>j</sup>B6 ♂ HFD ( $P < 0,05$ ; jednocestná ANOVA).

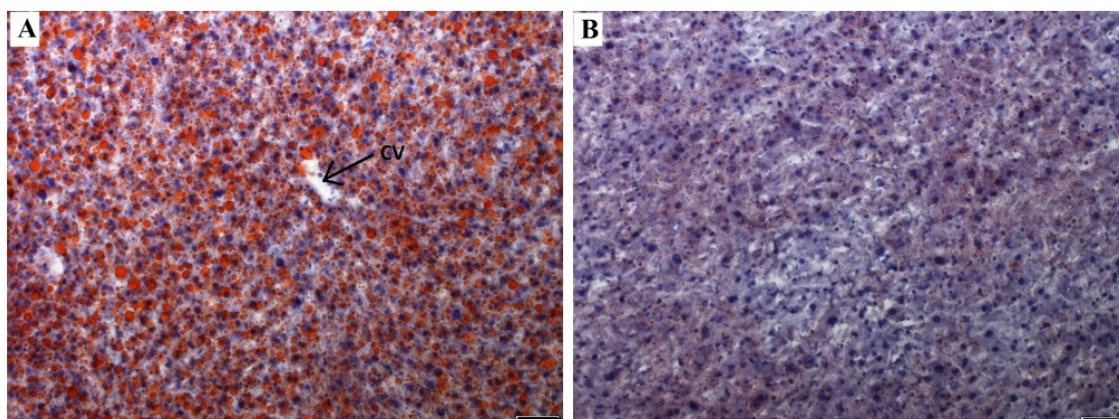
### TAG/celková tělesná hmotnost





**Graf 4: Závislost mezi koncentrací TAG v játrech a celkovou tělesnou hmotností u kmene B6 (A), kmene AJ (B), ♀ kmene B6 (C), ♀ kmene AJ (D), ♂ kmene B6 ( $r_s = 0,621$ ;  $P < 0,0001$ ; jednocestná ANOVA) (E), ♂ kmene AJ (F).**

Z jater byla odebrána také část pro přípravu kryořezů, které byly následně obarveny olejovou červení pro detekci lipidů (Obr. 10). Na obr. A je řez jater myši krmené HFD, jejíž hmotnost (m) v době disekce byla 40,4 g a koncentrace TAG (c) 114,28 mg/g tkáně. Játra na obr. B byla odebrána myši krměnou STD s  $m=28,9$  g a byla u nich stanovena  $c\text{ TAG}=22,34$  mg/g tkáně.

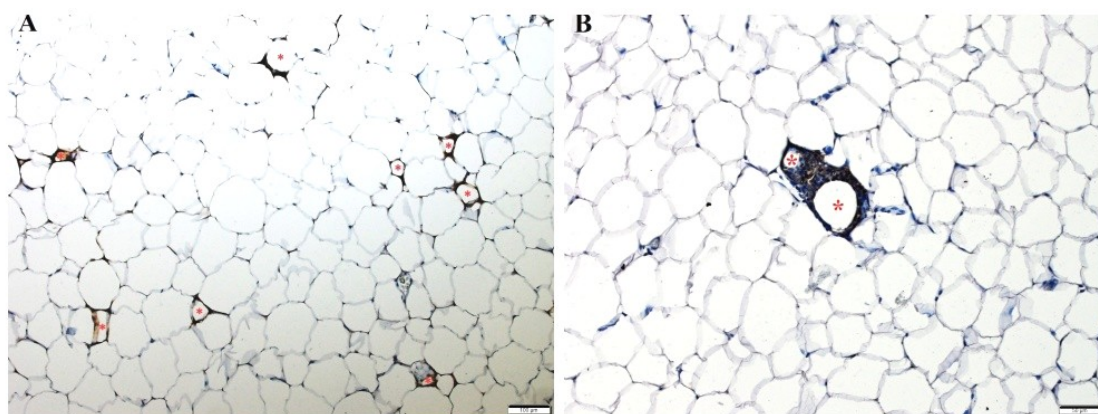


**Obr 10: Kryořezy jaterní tkáně barvené olejovou červení. Délka úsečky 50 µm. A) B6; 24T;  $m=40,4$  g;  $c\text{ TAG}=118,95$  mg/g tkáně; HFD, B) B6; 24T;  $m=28,9$  g;  $c\text{ TAG}=25,61$  mg/g tkáně; STD, CV - centrální vena**

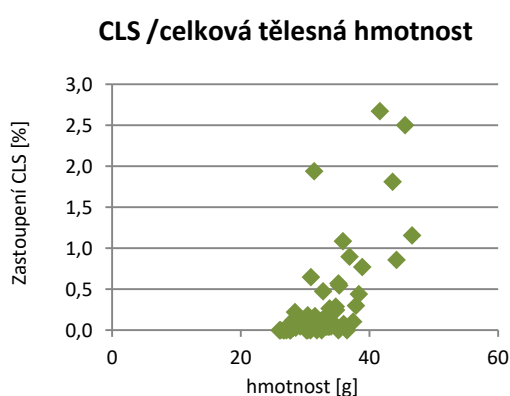
**Závěr:** Signifikantně vyšší obsah TAG v játrech byl naměřen u myši kmene B6 na HFD v porovnání s kontrolními zvířaty na STD. U myši kmene B6 bylo také pozorováno vyšší množství ektopicky uložených TAG než u kmene AJ, který je rezistentní k rozvoji obezity indukované dietou s vysokým obsahem tuku. U ♂ kmene B6 byla prokázána signifikantní korelace mezi koncentrací TAG v játrech a celkovou tělesnou hmotností.

### 5.1.2. Určení míry zánětu tukové tkáně

S ohledem na prokázání korelace mezi koncentrací TAG v játrech a celkovou tělesnou hmotností pouze u ♂ kmene B6, bylo provedeno imunohistochemické barvení MAC2 v GON tukovém depu jen u této skupiny. Barvení MAC2 se používá pro detekci M1 makrofágů, tvořících CLS okolo adipocytů, které v důsledku zánětlivé reakce podstupují buněčnou smrt (Obr. 11). Z každého řezu bylo na světelném mikroskopu pořízeno 8 snímků, z nichž byl optometricky odečten celkový počet adipocytů a počet CLS a vypočítán jejich procentuální podíl. Výsledná hodnota byla v grafu následně vynesena jako závislá proměnná na celkovou tělesnou hmotnost (Graf 5). Mezi těmito dvěma parametry byla prokázána signifikantní korelace ( $r_s = 0,6997$ ;  $P < 0,0001$ ) a rovněž tak i mezi koncentrací TAG v játrech a velikostí zánětu ( $r_s = 0,5595$ ;  $P < 0,0001$ ).



**Obr 11:** Snímky GON tukového depa imunohistochemicky barveného na MAC2 pro vizualizaci CLS (\*). Délka úsečky A) 100  $\mu\text{m}$  B) 50  $\mu\text{m}$ .



**Graf 5:** Korelace mezi množstvím CLS v GON tukovém depu a celkovou tělesnou hmotností u ♂ kmene B6. ( $r_s = 0,6997$ ;  $P < 0,0001$ )



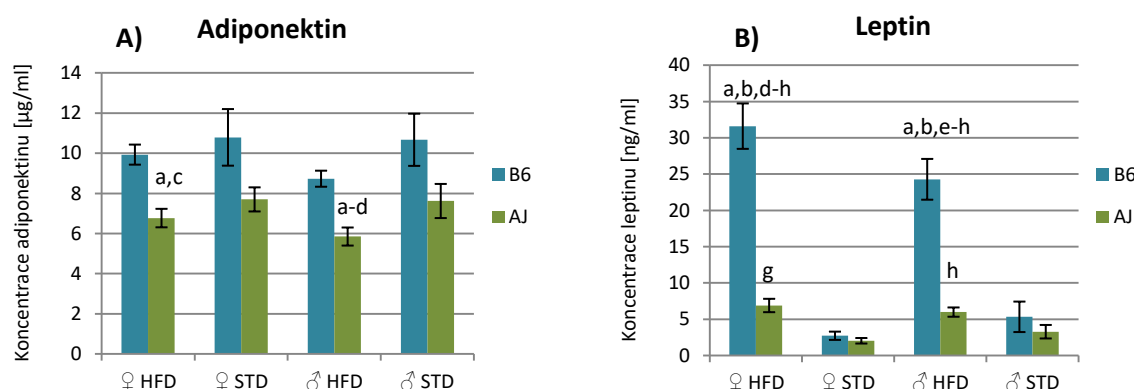
**Závěr:** U ♂ kmene B6 byla v GON prokázána signifikantní korelace mezi procentuálním zastoupením CLS a celkovou tělesnou hmotností a dále mezi procentuálním zastoupením CLS a koncentrací TAG v játrech.

### 5.1.3. Stanovení koncentrace adiponektinu a leptinu v plazmě

U myši ve 2, 4 a 24 týdnech byla stanovena koncentrace leptinu a adiponektinu v plazmě metodou BioPlex. Měření prováděla kolegyně Mgr. Jana Hansíková na oddělení Human and Animal Physiology, Wageningen University, Wageningen, v Nizozemsku. Tato metoda spočívá v imunoprecipitaci požadovaného proteinu prostřednictvím magnetických kuliček s kovalentně vázanou protilátkou, která je fluorescenčně značená. Výhodou metody BioPlex je možnost měřit proteiny i ve velmi nízkých koncentracích (pg/ml) v porovnání s jinými imunochemickými metodami.

Plazmatické hladiny adiponektinu vykazovaly ve 24T signifikantní rozdíl mezi kmeny u myši krmených HFD a to u obou pohlaví ( $P < 0,001$ ; Graf 6A). Statisticky významný rozdíl mezi kmeny myši ve 24T na HFD byl prokázán také u plazmatických hladin leptinu ( $P < 0,05$ ). Navíc, koncentrace leptinu u těchto myši byly signifikantně vyšší u obou kmenů i pohlaví v porovnání se zvířaty, kterým byla podávána STD ( $P < 0,05$ ; Graf 6B). U ♂ kmene B6 na HFD byla prokázána signifikantní korelace mezi hladinami leptinu v plazmě a koncentrací TAG v játrech ( $r_s = 0,5749$ ;  $P < 0,0001$ ), dále mezi hladinami leptinu v plazmě a velikostí zánětu v GON tukovém depu ( $r_s = 0,6255$ ;  $P < 0,0001$ ) a mezi plazmatickými hladinami leptinu a celkovou tělesnou hmotností ( $r_s = 0,793$ ;  $P < 0,0001$ ).

Plazmatické koncentrace leptinu a adiponektinu u myši ve 2T a 4T shrnují grafy 9 a 10 v kapitole 5.2.2.



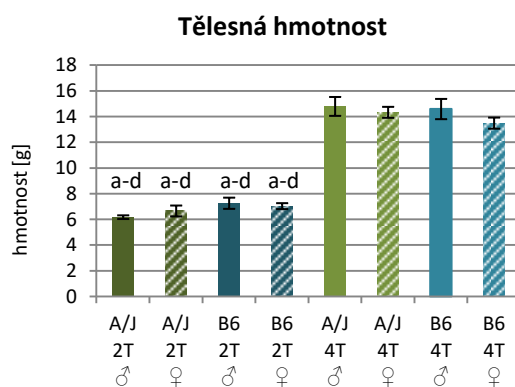
**Graf 6:** Koncentrace adiponektinu (A) a leptinu (B) v plazmě ve 24T. Signifikantní rozdíl v porovnání s <sup>a</sup>B6 ♀ STD, <sup>b</sup>B6 ♂ STD, <sup>c</sup>B6 ♀ HFD, <sup>d</sup>B6 ♂ HFD, <sup>e</sup>AJ ♀ HFD, <sup>f</sup>AJ ♂ HFD, <sup>g</sup>AJ ♀ STD, <sup>h</sup>AJ ♂ STD ( $P < 0,05$ ; jednocestná ANOVA).

**Závěr:** Plazmatické koncentrace adiponektinu a leptinu vykazovaly statisticky významné rozdíly mezi kmeny B6 a AJ u myší na HFD u obou pohlaví ( $AJ < B6$ ). Tyto myši měly navíc signifikantně vyšší hladinu leptinu v plazmě než kontrolní zvířata na STD. Mezi plazmatickou koncentrací leptinu a množstvím TAG v játrech a dále mezi plazmatickou koncentrací leptinu v plazmě a velikostí zánětu v GON tukovém depu ♂ kmene B6 na HFD byly prokázány signifikantní korelace.

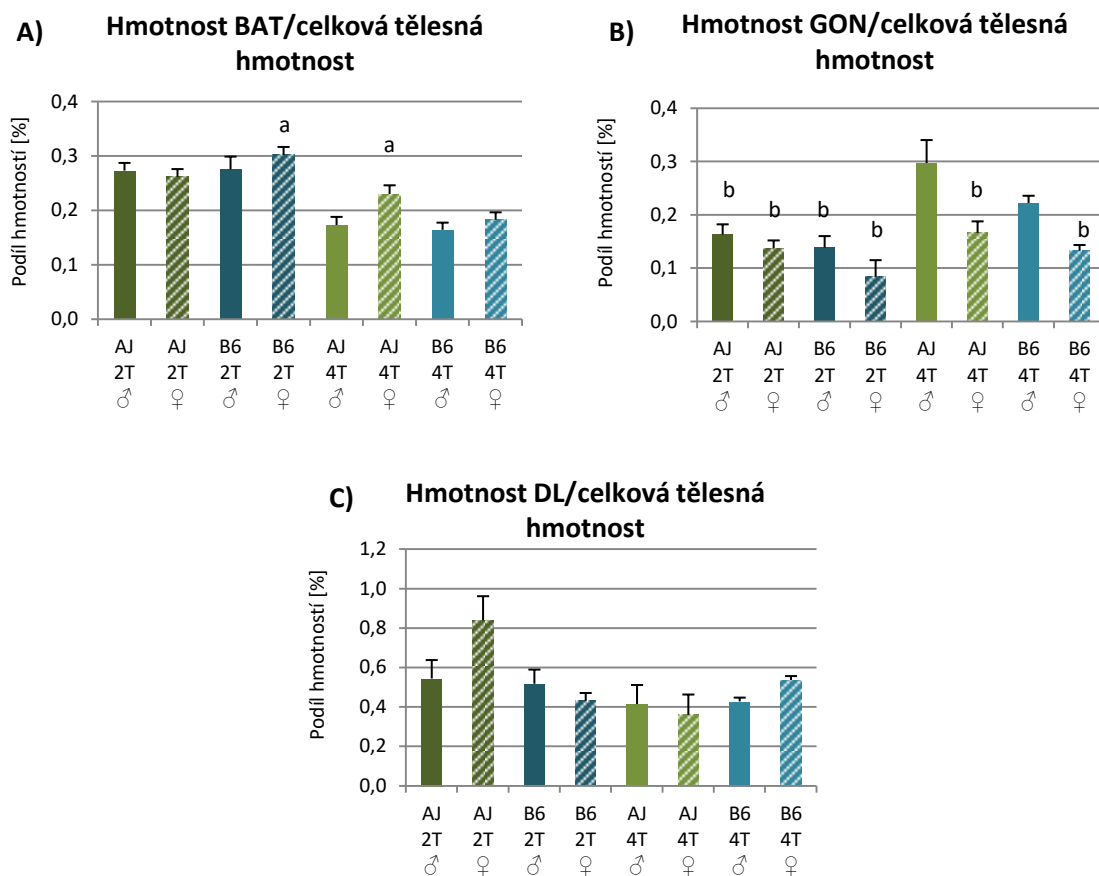
## **5.2. Porovnání morfologických a funkčních změn v tukové tkáni u myší kmene C57BL/6J a A/J v postnatálním období**

Pro bližší vysvětlení rozdílných hladin leptinu a adiponektinu ve vývoji v pokusu č. 1 (viz. kapitola 5.2.2.) byl proveden pokus č. 2. Porovnávány byly opět obě pohlaví dvou kmenů myší B6 a AJ a 2 věkové skupiny, 2 a 4 týdny po narození (2T a 4T). Myši byly kojeny a posléze přikrmovány speciální STD pro mláďata (viz. kapitola 4.2.2). Usmrceny byly cervikální dislokací a pro další analýzy bylo odebráno DL tukové depo, GON tukové depo, BAT a žaludek (ŽAL).

Celková tělesná hmotnost byla u obou kmenů i pohlaví signifikantně vyšší u myší ve 4T v porovnání s 2T ( $P < 0,05$ ; Graf 7). V celkové tělesné hmotnosti myší v tomto věku nebyly nicméně pozorovány žádné signifikantní rozdíly mezi kmeny či pohlavími. Podíl hmotnosti BAT na celkové tělesné hmotnosti měl tendenci klesat u myší ve 4T v porovnání se zvířaty ve 2T, nicméně tento pokles nebyl prokázán jako signifikantní (Graf 8A). V případě procentuálního zastoupení GON tukového depa se ve 4T začaly objevovat mezipohlavní rozdíly, kdy byl u ♂ pozorován větší podíl GON tukového depa na hmotnosti oproti ♀. Statisticky významný byl shledán tento rozdíl pouze u kmene AJ ( $P < 0,05$ ; Graf 8B). Podíl DL tukového depa na tělesné hmotnosti nevykazoval žádné signifikantní rozdíly (Graf 8C).



**Graf 7: Celková tělesná hmotnost při disekci.** Signifikantní rozdíl v porovnání s <sup>a</sup>AJ 4T ♂, <sup>b</sup>B6 4T ♂, <sup>c</sup>AJ 4T ♀, <sup>d</sup>B6 4T ♀ ( $P < 0,05$ ; jednocestná ANOVA).

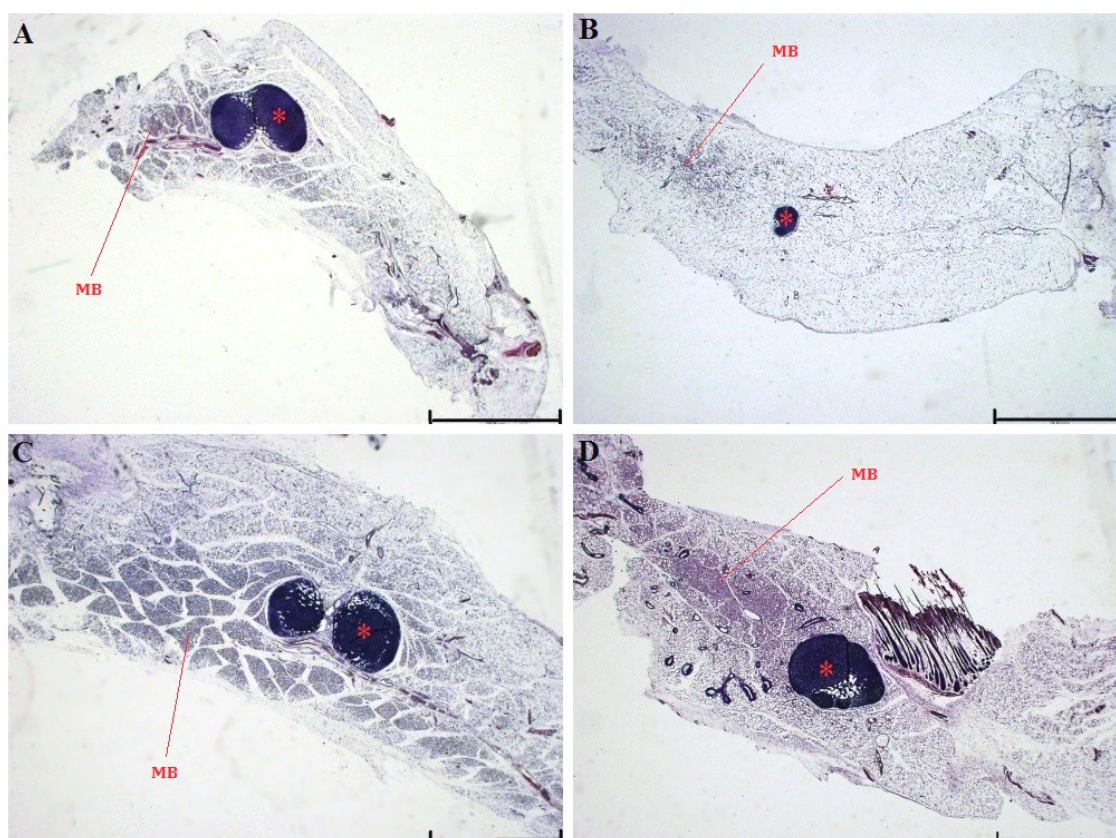


**Graf 8: Podíl hmotnosti BAT (A), GON tukového depa (B) a DL tukového depa (C) na celkové tělesné hmotnosti.** Signifikantní rozdíl v porovnání s <sup>a</sup>B6 4T ♂, <sup>b</sup>AJ 4T ♂ ( $P < 0,05$ ; jednocestná ANOVA).

### 5.2.1. Barvení hematoxylinem a eosinem a imunohistochemické barvení UCP1

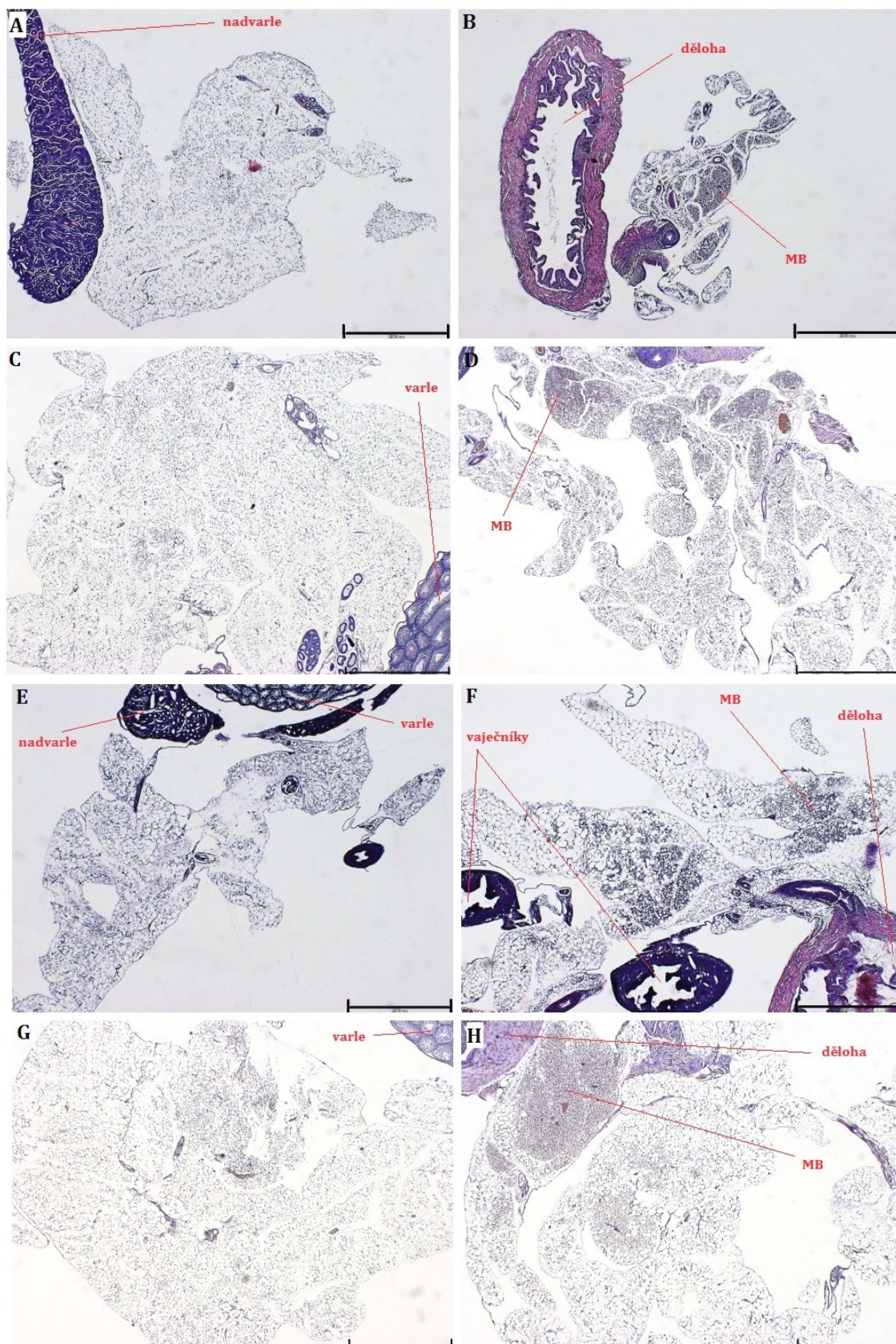
Vzorky GON a DL tukového depa byly pro účely histologického pozorování ve světelné mikroskopii nabarveny hematoxylinem a eosinem. V DL i GON tukovém depu obou kmenů i obou věkových skupin byl pozorován výskyt multilokulárních buněk (MB), tedy buněk s více lipidovými kapénkami. Optometricky bylo odhadnuto jejich procentuální zastoupení a provedeno porovnání.

V DL tukovém depu byl výskyt MB vyšší u kmene B6 než u kmene AJ. U obou kmenů byl rovněž pozorován nárůst počtu MB ve 4T v porovnání s 2T (Obr. 12), zatímco mezi pohlavími nebyly žádné rozdíly patrné. V GON tukovém depu byly patrné výrazné rozdíly mezi pohlavími. Zatímco u ♀ obou kmenů byly MB zastoupeny v určitém procentu v každém ze vzorků, u ♂ se prakticky nevyskytovaly. Mezi kmeny ani mezi věkovými skupinami nebyly v případě GON tukového depa pozorovány žádné významné rozdíly (Obr. 13).



**Obr. 12: DL barvené hematoxylinem a eosinem.** Délka úsečky 2000  $\mu\text{m}$ , A) B6; 2T; ♀, B) AJ; 2T; ♂, C) B6; 4T; ♂, D) AJ; 4T; ♀, (\*) - tříselná mízní uzlina, MB - multilokulární buňky

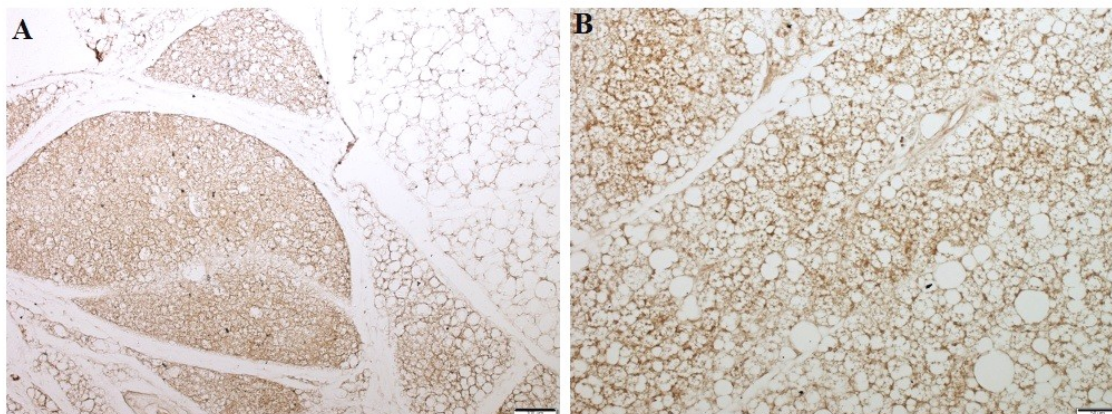




**Obr. 13: GON barvené hematoxylinem a eosinem. Délka úsečky 2000  $\mu$ m, A) B6; 2T; ♂, B) B6; 2T; ♀, C) B6; 4T; ♂, D) B6; 4T; ♀, E) A/J; 2T; ♂, F) A/J; 2T; ♀, G) A/J; 4T; ♂, H) A/J; 4T; ♀, MB - multilokulární buňky**



Pro zjištění, zdali jde o MB exprimující UCP1, bylo GON i DL tukové depo imunohistochemicky nabarveno. Hnědé zbarvení je indikátorem přítomnosti specifické vazby proteinu UCP1 a proti němu vyvinuté protilátky (Obr. 14).

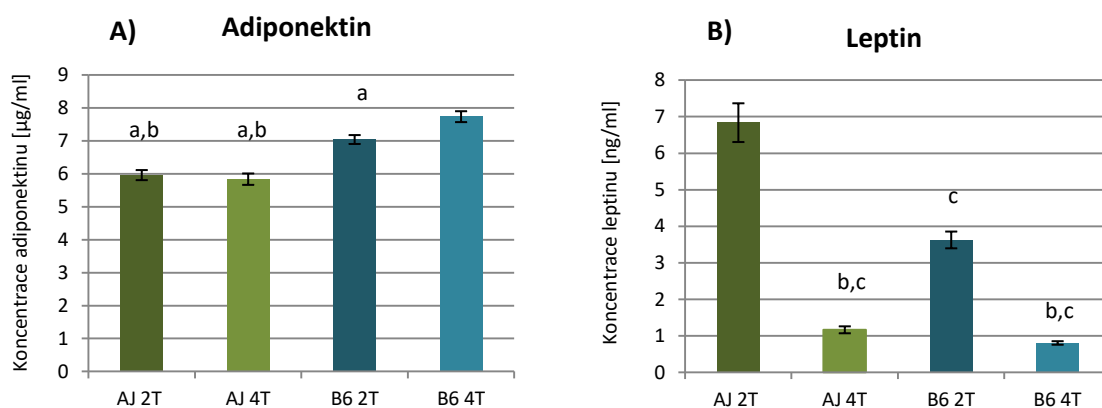


**Obr. 14: Detailní snímky MB v GON imunohistochemicky barveného na UCP1. A) Délka úsečky 100  $\mu$ m, B) Délka úsečky 50  $\mu$ m.**

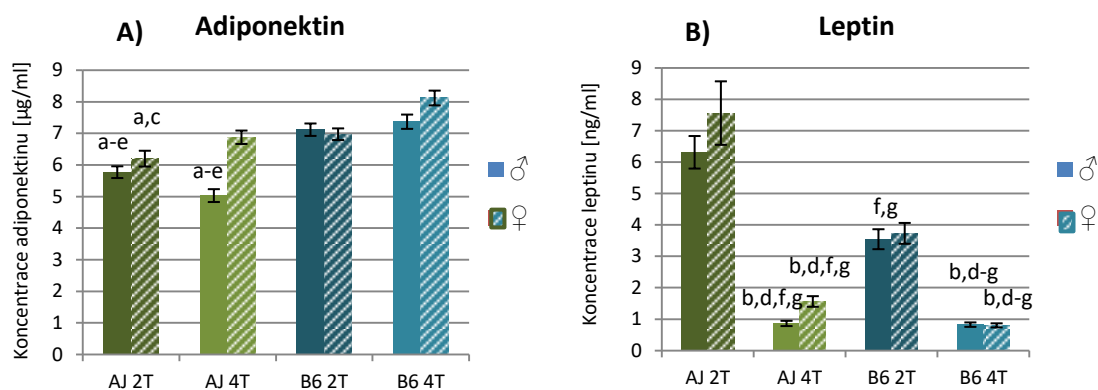
**Závěr:** U myši v postnatálním období byl v bílé tukové tkáni pozorován výskyt MB. V DL byl jejich počet větší u kmene B6 než AJ a u obou kmenů narůstal s věkem ( $2T < 4T$ ). V GON byly v zastoupení MB pozorovány rozdíly mezi pohlavími ( $\text{♂} < \text{♀}$ ), nikoliv mezi kmeny ani mezi věkovými skupinami. Imunohistochemické barvení potvrdilo, že jde o UCP1 pozitivní "brite" buňky.

### 5.2.2. Stanovení koncentrace leptinu a adiponektinu v plazmě

Koncentrace leptinu a adiponektinu v plazmě byla stanovována kolegyní Mgr. Janou Hansíkovou metodou BioPlex u vzorků z pokusu č. 1 (viz. kapitola 5.1.3.). U myši kmene B6 byly změřeny signifikantně vyšší koncentrace adiponektinu v plazmě než u kmene AJ a to u obou věkových skupin 2T i 4T ( $P < 0,001$ ). Statisticky významný rozdíl v plazmatických hladinách adiponektinu byl stanoven také mezi 2T a 4T skupinami kmene B6 ( $P < 0,05$ ; Graf 9A). Po rozdělení dat podle pohlaví se koncentrace adiponektinu mezi pohlavími nijak významně nelišily, jediný statisticky signifikantní rozdíl mezi pohlavími byl prokázán pouze u kmene AJ ve 4T ( $P < 0,001$ ; Graf 10A). V koncentracích leptinu došlo u obou kmenů k signifikantnímu poklesu ve 4T v porovnání s 2T ( $P < 0,001$ ). Myši kmene AJ měly ve 2T signifikantně vyšší hladiny leptinu v plazmě než stejně staré myši kmene B6 ( $P < 0,001$ ; Graf 9B). Plazmatické koncentrace leptinu rovněž nevykazovaly žádné statisticky významné rozdíly mezi pohlavími (Graf 10B).



**Graf 9: Koncentrace adiponektinu (A) a leptinu (B) v plazmě.** Signifikantní rozdíl v porovnání s <sup>a</sup>B6 4T ( $P<0,05$ ), <sup>b</sup>B6 2T, <sup>c</sup>AJ 2T ( $P<0,001$ ; jednocestná ANOVA).



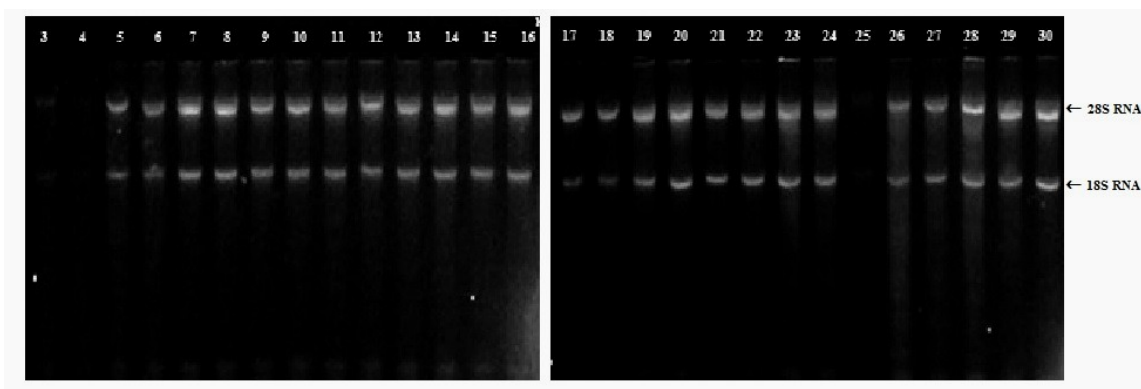
**Graf 10: Koncentrace adiponektinu (A) a leptinu (B) v plazmě u ♂ a ♀.** Signifikantní rozdíl v porovnání s <sup>a</sup>B6 4T ♀, <sup>b</sup>B6 2T ♂ ( $P<0,001$ ), <sup>c</sup>B6 4T ♂, <sup>d</sup>B6 2T ♀, <sup>e</sup>AJ 4T ♀, <sup>f</sup>AJ 2T ♀, <sup>g</sup>AJ 2T ♂, ( $P<0,05$ ; jednocestná ANOVA).

**Závěr:** Plazmatické hladiny adiponektinu vykazovaly statisticky významný rozdíl mezi kmeny B6 a AJ (AJ < B6), u kmene B6 byl navíc prokázán signifikantní rozdíl mezi myšmi ve věku 2 a 4T (B6 2T < B6 4T). Koncentrace leptinu v plazmě signifikantně klesla u obou kmenů ve 4T v porovnání se 2T. Myši kmene AJ ve 2T měly signifikantně vyšší plazmatické hladiny leptinu než stejně staré myši kmene B6 ve 2T.

### 5.2.3. Stanovení exprese mRNA leptinu

U obou kmenů (B6, AJ) byla stanoven genová exprese leptinu pro myši ve 2T a ve 4T metodou kvantitativní PCR (viz. kapitola 4.8.). Ze 4 tkání (DL tukové depo, GON tukové depo, BAT, ŽAL) byla izolována celková RNA. Vzhledem k absenci předchozích zkušeností s izolací RNA ze žaludku byla pro tuto RNA provedena

kontrola její integrity prostřednictvím nativní elektroforézy na agarovém gelu. RNA se ve většině vzorcích rozdělila do dvou zřetelných pruhů, které odpovídají 28S RNA a 18S RNA (Obr. 15). Blíže startu (na obr. orientován nahoře) se oddělila 28S RNA, která má větší velikosti (~ 4200 pb) než 18S RNA (~ 2300 pb), kterou detekuje druhý pruh. Na snímcích není patrný žádný výrazný smír značící degradovanou RNA. V případech, ve kterých se RNA nerozdělila, došlo pravděpodobně k chybnému nanesení daného vzorku do jamky, nebo k pochybení již během procesu izolace RNA.

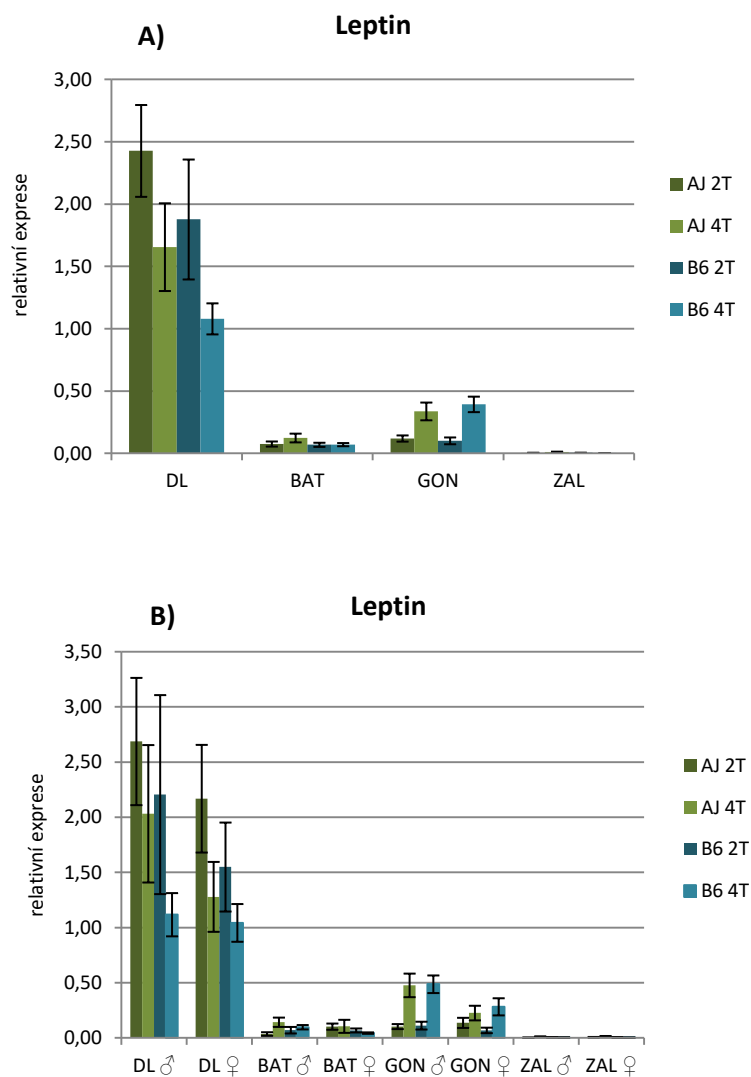


**Obr. 15:** Agarová gelová elektroforéza izolované RNA ze žaludku. 3-30 - číslo vzorku

**Závěr 1:** Výsledky z nativní gelové elektroforézy potvrdily, že během izolace RNA ze žaludku nedošlo k její degradaci.

Hodnoty získané z kvantitativní PCR byly vztaženy na geometrický průměr hladin referenčních genů 18S RNA a Hprt a pro porovnání genových expresí mezi jednotlivými tkáněmi byla navíc provedena relativní kvantifikace metodou  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Výsledné hodnoty jsou zaznamenány v grafu 11A. Na celkové expresi leptinu se ze všech 4 porovnávaných tkání nejvíce podílelo DL tukové depo. Míra genové exprese měla tendenci být vyšší u kmene AJ ve srovnání s kmenem B6 a u obou kmenů došlo ve 4T k jejímu poklesu, ačkoliv ani v jednom případě nebyly tyto rozdíly prokázány jako signifikantní. Druhá nejvyšší exprese byla změřena v GON tukovém depu, kde naopak docházelo ve 4T k jejímu nárůstu. Na expresi leptinu se podílela i BAT a ŽAL, ačkoliv jen ve velmi omezené míře v porovnání s DL. Po rozdělení dat na pohlaví jsme v DL i GON tukovém depu zjistili vyšší tendenci k expresi u samců v porovnání se samicemi (Graf 11B).





**Graf 11: Srovnání genové exprese mezi jednotlivými tkáněmi (A) a pohlavími (B).**

**Závěr 2:** Expres leptinu byla prokázána u všech 4 námi vybraných tkání. Nejvyšší expresi vykazovalo DL tukové depo, jako druhé do celkové exprese nejvíce přispívalo GON tukové depo. Je důležité si uvědomit, že velikost exprese neodráží míru vylučování leptinu do krevního oběhu.

## 6. Diskuze

### **Charakterizace vlivu diety s vysokým obsahem tuku na tukovou a jaterní tkáň**

V pokusu č. 1 bylo naším cílem popsat efekt diety s vysokým obsahem tuku (HFD) na množství ektopicky uložených TAG ve vzorcích jaterní tkáně a na velikost zánětlivé odpovědi v tukové tkáni. Dalším cílem bylo vyhodnotit vliv HFD na plazmatické koncentrace dvou významných adipokinů, totiž leptinu a adiponektinu.

Pro experiment byly použity kmeny myší B6 a AJ s rozdílnou náchylností k obezitě indukované dietou s vysokým obsahem tuku. Používaná HFD dieta obsahovala významný podíl kukuřičného oleje, který je zdrojem n-6 nenasycených mastných kyselin. Podáváním této diety byla u námi používaných myších modelů indukována obezita jen u kmene B6, zatímco kmen AJ jsme potvrdili jako rezistentní k obezitě. Zatímco podíl hmotnosti GON tukového depa byl signifikantně vyšší u myší kmene B6 i AJ na HFD v porovnání s kontrolními zvířaty na standardní dietě (STD), procentuální zastoupení jater na celkové hmotnosti bylo, poněkud překvapivě, nižší u myší na HFD.

U zvířat krmených HFD měla hmotnost GON tukového depa tendenci zaujímat větší podíl na celkové hmotnosti u myší kmene B6 v porovnání s kmenem AJ, podobně jako ve studii Surwita a kol. (Surwit et al. 1995).

### **Stanovení koncentrace TAG v játrech**

Zvýšený kalorický příjem vede k ektopickému ukládání lipidů i do jiných orgánů, než je tuková tkáň, a to především do jater a svalů (Fraulob et al. 2010; de Wilde et al. 2008). Během našich měření jsme zjistili signifikantně zvýšený obsah TAG v játrech myší kmene B6 na HFD v porovnání se zvířaty na STD. U kmene AJ, který je rezistentní k dietou indukované obezitě, k ektopickému ukládání tuků prakticky nedocházelo a mezi skupinou na HFD a kontrolní skupinou na STD tedy nebyl, podle očekávání, prokázán statisticky významný rozdíl. Signifikantní rozdíly byly pozorovány mezi kmeny B6 a AJ na HFD. V rozporu se studií Medříkové a kol. (Medřikova et al. 2012), jsme v našem experimentu naměřili vyšší obsah TAG u samic než u samců, ačkoliv statisticky signifikantní byl prokázán pouze u myší kmene B6 na HFD. Důvodem mohla být odlišná délka působení diety s vysokým obsahem tuku, zatímco v našem experimentu byla myším podávána po dobu 12 týdnů, ve studii Medříkové a kol.

15, potažmo 35 týdnů. Pro posouzení, zdali existuje závislost mezi množstvím TAG v játrech a celkovou hmotností, byly u obou kmenů provedeny korelace. Signifikantní korelace byla prokázána až po rozdělení stejných dat na pohlaví, a to pouze u samců kmene B6. Rozdíl v množství TAG v játrech mezi různě hmotnými zvířaty byl podložen také snímky z histologických kryořezů, na kterých je patrný rozdíl v počtu a velikosti tukových kapének u myši na HFD a STD, jak dokládají i další studie (Ono-Moore et al. 2017; Williams et al. 2014).

### **Velikost zánětu tukové tkáně**

V souladu s literaturou (Cinti et al. 2005) jsme v GON tukovém depu myši, u kterých byla indukována obezita, pozorovali výskyt prozánětlivých makrofágů tvořících CLS okolo mrtvých adipocytů. Vzhledem k tomu, že signifikantní korelaci mezi koncentrací TAG v játrech a celkovou hmotností vykazovali pouze samci kmene B6 na HFD, bylo imunohistochemické barvení provedeno pouze u této skupiny. Ve studii Strisselové a kol. byl zaznamenán signifikantní nárůst v počtu CLS až 12. týden po podávání obezogenní diety. Navíc, zvýšená infiltrace prozánětlivých makrofágů byla pozorována pouze v epididymálním tukovém depu samců (Strissel et al. 2007). Četnost CLS u myši chovaných 12 týdnů na HFD i v našem experimentu signifikantně rostla s celkovou hmotností zvířat, stejně jako v práci Jílkové a kol. (Jilkova et al. 2014). Navíc, statisticky významná korelace byla prokázána také mezi velikostí zánětu a koncentrací TAG v játrech, což nasvědčuje tomu, že jde skutečně o dva doprovodné jevy související s metabolickými komplikacemi obezity.

### **Stanovení koncentrace adiponektinu a leptinu v plazmě**

Hodnoty plazmatických hladin leptinu a adiponektinu jsou výsledkem měření kolegyně Mgr. Jany Hansíkové. Mnoho studií uvádí, že s expanzí tukové tkáně a rozvinutím obezity dochází k redukci hladin adiponektinu (Hu et al. 1996; Arita et al. 1999), nicméně naše měření toto tvrzení zcela nepotvrdila. Koncentrace adiponektinu v plazmě měly tendenci být nižší u myši krmených HFD v porovnání se zvířaty na STD, ale ani v jednom případě nebyly rozdíly signifikantní. Statisticky významný rozdíl byl prokázán pouze mezi kmeny na HFD, kdy byla jak u samic, tak samců kmene B6 naměřena vyšší koncentrace adiponektinu v plazmě než u myši kmene AJ. Neprůkazné rozdíly v hladinách adiponektinu mezi hubenými a obézními zvířaty by mohly být vysvětleny nedostatečně dlouhou dobou podávání obezogenní diety. Vyšší koncentrace

plazmatických hladin adiponektinu u myši kmene B6 v porovnání s kmenem AJ ve své studii uvádí i Bullen a kol.. Během experimentu dokonce pozorovali signifikantní zvýšení hladin adiponektinu u myši krmených HFD po dobu 10 týdnů v porovnání se zvířaty na STD. Po 18 týdnech na HFD/STD zaznamenali u myši kmene B6 pokles koncentrací plazmatického adiponektinu na původní hodnoty. Vzhledem k hypotézám, že vzrůstající hladiny adiponektinu v plazmě u myši kmene B6 by mohly být vysvětleny jako kompenzační mechanismus, kterým se organizmus snaží předejít rozvoji inzulinové rezistence (Bullen et al. 2007) se domníváme, že myši s tímto genetickým pozadím nejsou zcela vhodným modelem pro zkoumání vývoje plazmatických hladin adiponektinu v závislosti na obezitě.

Naproti tomu plazmatický leptin vykazoval signifikantně zvýšené hladiny u myši krmených HFD oproti myším na STD a to u obou kmenů i pohlaví. Ačkoliv k nárůstu koncentrací došlo u obou kmenů, u myši kmene B6 dosahovaly až 4násobně vyšších hodnot než u kmene AJ. Indukce obezity u myši kmene B6 i přes zvýšené hladiny plazmatického leptinu nasvědčuje tomu, že zde dochází k narušení zpětnovazebného působení leptinu a navození leptinové rezistence, jak ukázaly již předchozí studie (Prpic et al. 2003; Lin et al. 2000). U samců kmene B6 na HFD byla navíc prokázána signifikantní korelace mezi koncentrací leptinu v plazmě a celkovou tělesnou hmotností, což koresponduje s výsledky celé řady studií (Considine et al. 1996; Lin et al. 2000). V případě adiponektinu, ani v případě leptinu jsme neprokázaly žádné statisticky významné rozdíly mezi pohlavími, dokládáné v jiných studiích (Combs et al. 2003; Frederich et al. 1995; Saad et al. 1997).

### **Změny funkce tukové tkáně během postnatálního vývoje**

Pro pokus č. 2 byly použity myši ve věku 2 a 4 týdnů. Tyto časové body byly vybrány s ohledem na vývojové změny, ke kterým v této době dochází, a na technickou proveditelnost odběrů. Mláďata ve 2. týdnu již otevírají oči a začínají s prozkoumáváním prostředí i mimo hnízdo. Od této chvíle se mohou mimo mateřské mléko přikrmovat i pevnou stravou. Ve 4. týdnu jsou mláďata již zcela samostatná a bývají odstavována od matky do samostatných klecí. Takto staré myši přijímají už jen výhradně pevnou stravu.

### **Funkční a morfologické změny v tukové tkáni**

V DL a GON tukovém depu byl pozorován výskyt multilokulárních buněk. Jejich procentuální zastoupení se lišilo a v každém z jednotlivých dep vykazovalo jiný trend. V DL tukovém depu byl jejich počet vyšší u kmene B6 ve 2 týdnech než u myši kmene AJ a u obou kmenů došlo k jeho nárůstu mezi 2. a 4. týdnem. V GON tukovém depu vykazovaly zcela odlišný trend. Zde nebyly pozorovány rozdíly v zastoupení multilokulárních buněk mezi věkovými skupinami, ani mezi kmeny jako v případě DL tukového depa, ale pouze mezi pohlavími. Zatímco v GON tukovém depu samic, tedy periovariálním depu, byly široce zastoupené, v epididymálním depu samců se prakticky nevyskytovaly. Vzhledem k tomu, že mezipohlavní rozdíly byly pozorovány pouze v GON, nikoliv DL tukovém depu, se domníváme, že větší predispozice k hnědnutí v periovariálním depu může souviset s mateřskou funkcí a skýtat benefiční účinky během březosti. Imunohistochemické barvení totiž potvrdilo, že se jedná o "brite" buňky exprimující UCP1, a že se tedy s největší pravděpodobností podílejí na produkci tepla. Tento fenomén byl zaznamenán již v předchozích studiích (Lasar et al. 2013; Xue et al. 2007), kde pozorovali v inguinálním, potažmo v retroperitoneálním tukovém depu samců vzrůstající počet "brite" buněk mezi 10. a 30. postnatálním dnem, podobně jako v naší studii. Jejich výskyt připisují přechodu z kojení na pevnou stravu či teplotním stresorům souvisejícím s opouštěním hnízda. Pro potvrzení těchto hypotéz by bylo vhodné doplnit současné výsledky o studii prováděnou na mláďatech chovaných v termoneutrální zóně (~ 30 °C). Rozdíly v náchylnosti jednotlivých tukových dep k hnědnutí by mohly souviset s jejich vývojem v různých fázích ontogeneze. Zajímavé je, že epididymální tukové depo samců se objevuje až postnatálně a zároveň jeho buňky nevykazují v žádném období charakter "brite" buněk. To by mohlo částečně vysvětlovat nulovou odpověď epididymálního tukového depa na indukci exprese UCP1 u dospělých jedinců, která může být vyvolána např. působením chenodeoxycholové kyseliny (Teodoro et al. 2014) nebo chladovou expozicí (Flachs et al. 2017).

### **Stanovení koncentrace leptinu a adiponektinu v plazmě**

Podobně jako u myši ve 24. týdnu, byla u mláďat ve 2 i ve 4 týdnech prokázána signifikantně vyšší plazmatická koncentrace adiponektinu u kmene B6 v porovnání s kmenem AJ. Ke statisticky významnému nárůstu hladiny adiponektinu mezi 2. a 4. týdnem došlo pouze u myši kmene B6. V koncentracích leptinu byl pozorován neobvyklý trend. Mláďata kmene AJ ve 2 týdnech měla téměř 6násobně zvýšené

plazmatické hladiny leptinu než myši ve 4 týdnech a i v případě kmene B6 byl tento rozdíl asi 4násobný. Takto zvýšené koncentrace leptinu u myši v rané fázi postnatálního vývoje byly pozorovány i v dalších studiích (Ahima et al. 1998; Devaskar et al. 1997). Hypotéz pro jejich vysvětlení existuje několik, avšak nejpravděpodobnější se jeví ta, že leptin, kromě své hlavní funkce regulovat energetickou rovnováhu v těle, se pravděpodobně podílí i na řízení vývoje neuroendokrinní osy (Ahima et al. 1998).

### **Stanovení exprese mRNA leptinu**

Příspěvek jednotlivých tkání k plazmatické hladině leptinu jsme se snažili přibližně odhadnout stanovením míry exprese mRNA, což nemusí být fyziologicky významné, ale podle práce (Yura et al. 2005) souvisí exprese mRNA v subkutánní tukové tkáni s hladinou leptinu v plazmě. Na základě studií, dokládajících expresi leptinu i mimo bílou tukovou tkáň, jsme pro stanovení genové exprese vybrali kromě GON a DL tukového depa i BAT (Moinat et al. 1995) a žaludek (Bado et al. 1998). Jelikož jsme neměli doposud žádné zkušenosti s izolací RNA ze žaludku a tedy ani zavedený protokol, provedli jsme před reverzní transkripcí kontrolu integrity této RNA pomocí nativní elektroforézy. Výsledky ukázaly, že izolace ve většině vzorcích proběhla správně a nedošlo během ní k degradaci RNA.

Aby bylo možné mezi sebou porovnat genovou expresi v jednotlivých tkáních, bylo nutné provést relativní kvantifikaci metodou  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak and Schmittgen 2001). Všechny hodnoty byly vztaženy k hodnotám změřeným v DL tukovém depu u myši kmene B6 ve 4 týdnech. Nejvyšší míru genové exprese leptinu ze všech čtyř zkoumaných tkání vykazovalo DL tukové depo. Tendenci k vyšší expresi měly myši kmene AJ ve srovnání s kmenem B6 a porovnáváme-li věkové skupiny, pak myši ve věku 4 týdnů v porovnání s 2týdenními. Patrně z důvodu nízkého počtu zvířat, nebylo možné dosáhnout dostatečné síly testu a signifikance. Druhá nejvyšší exprese byla naměřena v GON tukovém depu, kde naopak docházelo mezi 2. a 4. týdnem k jejímu nárůstu u obou kmenů, což nekoresponduje s vývojem plazmatických hladin leptinu. V souladu s literaturou (Moinat et al. 1995; Oliver et al. 2001; Bado et al. 1998) jsme expresi leptinu potvrdili i v BAT a žaludku, ačkoliv jen ve velmi omezené míře. Po rozdělení dat na pohlaví jsme zjistili vyšší tendenci k expresi leptinu v DL i GON tukovém depu u samců v porovnání se samicemi.

Při srovnávání míry genové exprese leptinu a morfologických změn v DL a GON tukovém depu byly shledány určité souvislosti. V DL tukovém depu se u obou kmenů

zvyšoval počet "brite" buněk mezi 2. a 4. týdnem a zároveň klesala exprese leptinu, což koresponduje s významně vyšší mírou exprese v bílých adipocytech v porovnání s hnědými, potažmo "brite" buňkami. V epididymálním depu samců, kde se "brite" buňky téměř nevyskytovaly, byla naměřena vyšší exprese než v periovariálním depu samic, ve kterém byly "brite" buňky hojně zastoupeny. V tomto případě však, byl rozdíl v genové expresi leptinu mezi pohlavími velmi malý, zvláště pak, přičteme-li vyšší podíl hmotnosti GON tukového depa na celkovou hmotnost u samců než u samic.

Genová exprese leptinu v námi vybraných tkáních nekorespondovala jednoznačně s hladinami leptinu v plazmě, jak bylo pozorováno v jiných studiích (Yura et al. 2005). Zatímco u myší ve 4. týdnu byla koncentrace plazmatického leptinu výrazně snížena v porovnání se 2týdenními myši, v DL tukovém depu došlo mezi 2 a 4. týdnem pouze k mírnému poklesu exprese, který nebyl prokázán jako statisticky významný. Navíc, ostatní tkáně vykazovaly opačný trend, tedy vyšší míru exprese ve 4. týdnu v porovnání s expresí ve 2 týdnech. Vysvětlením by mohl být nevhodný výběr časových bodů, které ne zcela dobře zachycují vývoj exprese leptinu a jeho plazmatických hladin v postnatálním období, jak ukazují výsledky studie Devaskara a kol. V této práci sledovali časový průběh mRNA leptinu a jeho proteinu a zaznamenali, že zatímco exprese leptinu dosahuje u myší maxima v 7.dnu a poté dramaticky klesá až do 14. dne věku, koncentrace leptinu se v plazmě udržuje na vysoké hladině až do 14. dne a teprve potom dochází k jejímu poklesu (Devaskar et al. 1997). V rozporu jsou výsledky také se závěry studie Trayhurna a kol., která tvrdí, že genová exprese leptinu převládá u myší ve viscerální tukové tkáni, konkrétně v GON tukovém depu, zatímco v našem případě dominovala v subkutánním DL tukovém depu. Tyto rozdílné závěry by mohly být vysvětleny použitím modelových zvířat v různých stupních vývoje (2T, 4T vs. 10T).

Závěrem je možno říci, že jsme potvrdili hypotézu, že dieta s vysokým obsahem tuku zvyšuje ektopické ukládání tuků do jater a indukuje v tukové tkáni zánětlivou reakci, a dále, že v časném postnatálním vývoji dochází k funkčním a morfologickým změnám v tukové tkáni, které pravděpodobně souvisí s adaptací mláďat na okolní prostředí a nutričními změnami.

## 7. Závěr

V prvním pokusu jsme charakterizovali účinek diety s vysokým obsahem tuku na tukovou a jaterní tkáň. V tukové tkáni jsme u samců kmene B6 prokázali korelaci mezi velikostí zánětu a celkovou tělesnou hmotností. Podle předpokladu jsme u myší kmene B6 na HFD stanovili vyšší obsah TAG v játrech v porovnání s kontrolními zvířaty na HFD i v porovnání s kmenem AJ a u samců kmene B6 jsme dále prokázali korelaci mezi množstvím TAG a velikostí zánětu. Myši na HFD vykazovaly vyšší hladiny plazmatického leptinu, zatímco pokles hladin adiponektinu v plazmě se nám u této skupiny zvířat nepodařilo prokázat. Podobně jsme v plazmatických hladinách leptinu a adiponektinu neprokázali rozdíly mezi pohlavími. U samců kmene B6 korelovaly hladiny leptinu v plazmě s celkovou tělesnou hmotností a s velikostí zánětu.

V druhém pokusu jsme zaznamenali morfologické změny v depech bílé tukové tkáně, ve kterých byly mezi 14. a 28. postnatálním dnem pozorovány ostrůvky UCP1 pozitivních buněk. Jejich procentuální zastoupení se lišilo mezi pohlavími, věkovými skupinami i mezi kmeny v závislosti na typu depa. Plazmatické hladiny adiponektinu byly vyšší u kmene B6 než u kmene AJ a mezi pohlavími jsme oproti předpokladu neprokázali žádné výrazné rozdíly. U obou kmenů myší jsme ve 2. týdnu zaznamenali zvýšené hladiny leptinu v plazmě, u kterých došlo ve 4. týdnu k významnému poklesu. Dále jsme stanovili míru exprese mRNA leptinu ve čtyřech tkáních, včetně dvou tukových dep. Výsledky ukázaly, že nejvyšší expresi leptinu vykazovala právě tuková depa, přičemž vyšší exprese byla zaznamenána v dorzolumbálním tukovém depu v porovnání s gonadálním. Expresi mRNA leptinu jsme prokázali také v hnědé tukové tkáni a žaludku. Mezi genovou expresí leptinu a jeho plazmatickými hladinami jsme neprokázali přímý vztah.



## 8. Seznam použité literatury

- AGUIRRE, V., T. UCHIDA, L. YENUSH, R. DAVIS, et al. The c-Jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *Journal of Biological Chemistry*, Mar 2000, 275(12), 9047-9054.
- AHIMA, R. S., D. PRABAKARAN AND J. S. FLIER Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding - Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *Journal of Clinical Investigation*, Mar 1998, 101(5), 1020-1027.
- AHIMA, R. S., D. PRABAKARAN, C. MANTZOROS, D. Q. QU, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, Jul 1996, 382(6588), 250-252.
- AHMADIAN, M., M. J. ABBOTT, T. Y. TANG, C. S. S. HUDAK, et al. Desnutrin/ATGL Is Regulated by AMPK and Is Required for a Brown Adipose Phenotype. *Cell Metabolism*, Jun 2011, 13(6), 739-748.
- ALTAREJOS, J. Y. AND M. MONTMINY CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Mar 2011, 12(3), 141-151.
- AMBATI, S., H. K. KIM, J. Y. YANG, J. LIN, et al. Effects of leptin on apoptosis and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical Pharmacology*, Feb 2007, 73(3), 378-384.
- ARITA, Y., S. KIHARA, N. OUCHI, M. TAKAHASHI, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Apr 1999, 257(1), 79-83.
- ASHWORTH, C. J., N. HOGGARD, L. THOMAS, J. G. MERCER, et al. Placental leptin. *Reviews of Reproduction*, Jan 2000, 5(1), 18-24.
- ATKINSON, L. L., M. A. FISCHER AND G. D. LOPASCHUK Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis. *Journal of Biological Chemistry*, Aug 2002, 277(33), 29424-29430.
- BADO, A., S. LEVASSEUR, S. ATTOUB, S. KERMORGANT, et al. The stomach is a source of leptin. *Nature*, Aug 1998, 394(6695), 790-793.
- BAI, Y. L., S. Y. ZHANG, K. S. KIM, J. K. LEE, et al. Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *Journal of Biological Chemistry*, Jun 1996, 271(24), 13939-13942.
- BARBATELLI, G., I. MURANO, L. MADSEN, Q. HAO, et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, Jun 2010, 298(6), E1244-E1253.
- BELL, L. N., L. CAI, B. H. JOHNSTONE, D. O. TRAKTUEV, et al. A central role for hepatocyte growth factor in adipose tissue angiogenesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, Feb 2008, 294(2), E336-E344.
- BEZARD, J., J. P. BLOND, A. BERNARD AND P. CLOUET THE METABOLISM AND AVAILABILITY OF ESSENTIAL FATTY-ACIDS IN ANIMAL AND HUMAN TISSUES. *Reproduction Nutrition Development*, 1994, 34(6), 539-568.
- BJORBAEK, C., J. K. ELMQUIST, J. D. FRANTZ, S. E. SHOELSON, et al. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Molecular Cell*, Mar 1998, 1(4), 619-625.

- BLANCHETTEMACKIE, E. J., N. K. DWYER, T. BARBER, R. A. COXEY, et al. PERILIPIN IS LOCATED ON THE SURFACE-LAYER OF INTRACELLULAR LIPID DROPLETS IN ADIPOCYTES. *Journal of Lipid Research*, Jun 1995, 36(6), 1211-1226.
- BONIZZU, G. AND M. KARIN The two NF-kappa B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*, Jun 2004, 25(6), 280-288.
- BORDONE, L. AND L. GUARENTE Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: Understanding longevity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Apr 2005, 6(4), 298-305.
- BOSTROM, P., J. WU, M. P. JEDRYCHOWSKI, A. KORDE, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, Jan 2012, 481(7382), 463-467.
- BRAKENHIELM, E., N. VEITONMAKI, R. H. CAO, S. KIHARA, et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Feb 2004, 101(8), 2476-2481.
- BRASAEMLE, D. L., B. RUBIN, I. A. HARTEN, J. GRUIA-GRAY, et al. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, Dec 2000, 275(49), 38486-38493.
- BULLEN, J. W., S. BLUHER, T. KELESIDIS AND C. S. MANTZOROS Regulation of adiponectin and its receptors in response to development of diet-induced obesity in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, Apr 2007, 292(4), E1079-E1086.
- CAMPFIELD, L. A., F. J. SMITH, Y. GUISEZ, R. DEVOS, et al. RECOMBINANT MOUSE OB PROTEIN - EVIDENCE FOR A PERIPHERAL SIGNAL LINKING ADIPOSITY AND CENTRAL NEURAL NETWORKS. *Science*, Jul 1995, 269(5223), 546-549.
- CANNON, B. AND J. NEDERGAARD Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiological Reviews*, Jan 2004, 84(1), 277-359.
- CANNON, B. AND J. NEDERGAARD Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *Journal of Experimental Biology*, Jan 2011, 214(2), 242-253.
- CANNON, B. AND G. VOGEL MITOCHONDRIAL ATPASE OF BROWN ADIPOSE-TISSUE - PURIFICATION AND COMPARISON WITH MITOCHONDRIAL ATPASE FROM BEEF-HEART. *Febs Letters*, 1977, 76(2), 284-289.
- CARMEN, G. Y. AND S. M. VICTOR Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cellular Signalling*, Apr 2006, 18(4), 401-408.
- CHRISTIAENS, V. AND H. R. LIJNEN Angiogenesis and development of adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Apr 2010, 318(1-2), 2-9.
- CINTI, S. Reversible transdifferentiation in the adipose organ. *International Journal of Pediatric Obesity*, 2008, 3, 21-26.
- CINTI, S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, Nov 2009, 297(5), E977-E986.
- CINTI, S. The adipose organ at a glance. *Disease Models & Mechanisms*, Sep 2012, 5(5), 588-594.
- CINTI, S., R. C. FREDERICH, M. C. ZINGARETTI, R. DEMATTEIS, et al. Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology*, Feb 1997, 138(2), 797-804.

- CINTI, S., G. MITCHELL, G. BARBATELLI, I. MURANO, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*, Nov 2005, 46(11), 2347-2355.
- CNOP, M., P. J. HAVEL, K. M. UTZSCHNEIDER, D. B. CARR, et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*, Apr 2003, 46(4), 459-469.
- COCKERILL, G. W., K. A. RYE, J. R. GAMBLE, M. A. VADAS, et al. HIGH-DENSITY-LIPOPROTEINS INHIBIT CYTOKINE-INDUCED EXPRESSION OF ENDOTHELIAL-CELL ADHESION MOLECULES. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, Nov 1995, 15(11), 1987-1994.
- COLEMAN, R. A. AND D. P. LEE Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in Lipid Research*, Mar 2004, 43(2), 134-176.
- COLEMAN, R. A., T. M. LEWIN AND D. M. MUOIO Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annual Review of Nutrition*, 2000, 20, 77-103.
- COMBS, T. P., A. H. BERG, M. W. RAJALA, S. KLEBANOV, et al. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes*, Feb 2003, 52(2), 268-276.
- COMMISSION, I. T. Glossary of terms for thermal physiology - Third edition (Reprinted from the *Japanese Journal of Physiology*). *Journal of Thermal Biology*, Jan 2003, 28(1), 75-106.
- CONSIDINE, R. V., M. K. SINHA, M. L. HEIMAN, A. KRIAUCIUNAS, et al. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine*, Feb 1996, 334(5), 292-295.
- CORVERA, S. AND O. GEALEKMAN Adipose tissue angiogenesis: Impact on obesity and type-2 diabetes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, Mar 2014, 1842(3), 463-472.
- COUSIN, B., S. CINTI, M. MORRONI, S. RAIMBAULT, et al. OCCURRENCE OF BROWN ADIPOCYTES IN RAT WHITE ADIPOSE-TISSUE - MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION. *Journal of Cell Science*, Dec 1992, 103, 931-942.
- COWLEY, M. A., J. L. SMART, M. RUBINSTEIN, M. G. CORDAN, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, May 2001, 411(6836), 480-484.
- CROWLEY, V. E. E., G. S. H. YEO AND S. O'RAHILLY Obesity therapy: Altering the energy intake- and- expenditure balance sheet. *Nature Reviews Drug Discovery*, Apr 2002, 1(4), 276-286.
- CURAT, C. A., A. MIRANVILLE, C. SENGES, M. DIEHL, et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages - Induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*, May 2004, 53(5), 1285-1292.
- DALÉN, K. T., K. SCHOONJANS, S. M. ULVEN, M. S. WEEDON-FEKJAER, et al. Adipose tissue expression of the lipid droplet-associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*, May 2004, 53(5), 1243-1252.
- DE WILDE, J., R. MOHREN, S. VAN DEN BERG, M. BOEKSCHOTEN, et al. Short-term high fat-feeding results in morphological and metabolic adaptations in the skeletal muscle of C57BL/6J mice. *Physiological Genomics*, Feb 2008, 32(3), 360-369.

- DEANGELIS, R. A., M. M. MARKIEWSKI, R. TAUB AND J. D. LAMBRIS A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappa B inhibitor, I kappa B alpha. *Hepatology*, Nov 2005, 42(5), 1148-1157.
- DEVASKAR, S. U., C. OLLESCH, R. A. RAJAKUMAR AND P. A. RAJAKUMAR Developmental changes in ob gene expression and circulating leptin peptide concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Sep 1997, 238(1), 44-47.
- EL-HASCHIMI, K., D. D. PIERROZ, S. M. HILEMAN, C. BJORBAEK, et al. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *Journal of Clinical Investigation*, Jun 2000, 105(12), 1827-1832.
- ENERBACK, S. The Origins of Brown Adipose Tissue. *New England Journal of Medicine*, May 2009, 360(19), 2021-2023.
- FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, May 2005, 115(5), 911-919.
- FASSHAUER, M., J. KLEIN, S. NEUMANN, M. ESZLINGER, et al. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Jan 2002, 290(3), 1084-1089.
- FLACHS, P., K. ADAMCOVA, P. ZOUHAR, C. MARQUES, et al. Induction of lipogenesis in white fat during cold exposure in mice: link to lean phenotype. *International Journal of Obesity*, Mar 2017, 41(3), 372-380.
- FONTANA, L., T. E. MEYER, S. KLEIN AND J. O. HOLLOSZY Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Apr 2004, 101(17), 6659-6663.
- FORETZ, M., C. GUICHARD, P. FERRE AND F. FOUFELLE Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Oct 1999, 96(22), 12737-12742.
- FRAULOB, J. C., R. OGG-DIAMANTINO, C. FERNANDES-SANTOS, M. B. AGUILA, et al. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, May 2010, 46(3), 212-223.
- FREDERICH, R. C., A. HAMANN, S. ANDERSON, B. LOLLMANN, et al. LEPTIN LEVELS REFLECT BODY LIPID-CONTENT IN MICE - EVIDENCE FOR DIET-INDUCED RESISTANCE TO LEPTIN ACTION. *Nature Medicine*, Dec 1995, 1(12), 1311-1314.
- FREDRIKSON, G., P. STRALFORS, N. O. NILSSON AND P. BELFRAGE HORMONE-SENSITIVE LIPASE OF RAT ADIPOSE-TISSUE - PURIFICATION AND SOME PROPERTIES. *Journal of Biological Chemistry*, 1981, 256(12), 6311-6320.
- GOODMAN, J. M. The gregarious lipid droplet. *Journal of Biological Chemistry*, Oct 2008, 283(42), 28005-28009.
- GORDON, C. J. Thermal physiology of laboratory mice: Defining thermoneutrality. *Journal of Thermal Biology*, Dec 2012, 37(8), 654-685.
- GREENBERG, A. S., J. J. EGAN, S. A. WEK, N. B. GARTY, et al. PERILIPIN, A MAJOR HORMONALLY REGULATED ADIPOCYTE-SPECIFIC PHOSPHOPROTEIN ASSOCIATED WITH THE PERIPHERY OF LIPID STORAGE DROPLETS. *Journal of Biological Chemistry*, Jun 1991, 266(17), 11341-11346.

- GREGOIRE, F. M., C. M. SMAS AND H. S. SUL Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews*, Jul 1998, 78(3), 783-809.
- GUERRA, C., R. A. KOZA, H. YAMASHITA, K. WALSH, et al. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control - Effects on body weight and adiposity. *Journal of Clinical Investigation*, Jul 1998, 102(2), 412-420.
- HALAAS, J. L., K. S. GAJIWALA, M. MAFFEI, S. L. COHEN, et al. WEIGHT-REDUCING EFFECTS OF THE PLASMA-PROTEIN ENCODED BY THE OBESE GENE. *Science*, Jul 1995, 269(5223), 543-546.
- HAN, J., J. E. LEE, J. JIN, J. S. LIM, et al. The spatiotemporal development of adipose tissue. *Development*, Nov 2011, 138(22), 5027-5037.
- HAN, S., H. M. SUN, K. C. HWANG AND S. W. KIM Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells: Update on Clinical Utility and Efficacy. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 2015, 25(2), 145-152.
- HAUSMAN, G. J. AND R. G. KAUFFMAN THE HISTOLOGY OF DEVELOPING PORCINE ADIPOSE-TISSUE. *Journal of Animal Science*, Aug 1986, 63(2), 642-658.
- HOTTA, K., T. FUNAHASHI, Y. ARITA, M. TAKAHASHI, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, Jun 2000, 20(6), 1595-1599.
- HSIEH, A. C. L. AND L. D. CARLSON ROLE OF ADRENALINE AND NORADRENALINE IN CHEMICAL REGULATION OF HEAT PRODUCTION. *American Journal of Physiology*, 1957, 190(2), 243-246.
- HU, E., P. LIANG AND B. M. SPIEGELMAN AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry*, May 1996, 271(18), 10697-10703.
- HUBE, F., U. LIETZ, M. IGEL, P. B. JENSEN, et al. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Hormone and Metabolic Research*, Dec 1996, 28(12), 690-693.
- JENKINS, C. M., D. J. MANCUSO, W. YAN, H. F. SIMS, et al. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A(2) family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *Journal of Biological Chemistry*, Nov 2004, 279(47), 48968-48975.
- JILKOVA, Z. M., M. HENSLER, D. MEDRIKOVA, P. JANOVSKA, et al. Adipose tissue-related proteins locally associated with resolution of inflammation in obese mice. *International Journal of Obesity*, Feb 2014, 38(2), 216-223.
- JUMP, D. B., S. D. CLARKE, A. THELEN AND M. LIIMATTA COORDINATE REGULATION OF GLYCOLYTIC AND LIPOGENIC GENE-EXPRESSION BY POLYUNSATURATED FATTY-ACIDS. *Journal of Lipid Research*, Jun 1994, 35(6), 1076-1084.
- KERSTEN, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *Embo Reports*, Apr 2001, 2(4), 282-286.
- KIM, K. H., K. LEE, Y. S. MOON AND H. S. SUL A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, Apr 2001, 276(14), 11252-11256.
- KRAEMER, F. B. AND W. J. SHEN Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *Journal of Lipid Research*, Oct 2002, 43(10), 1585-1594.

- LASAR, D., A. JULIUS, T. FROMME AND M. KLINGENSPOR Browning attenuates murine white adipose tissue expansion during postnatal development. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, May 2013, 1831(5), 960-968.
- LEFEBVRE, P. J. AND A. S. LUYCKX EFFECT OF INSULIN ON GLUCAGON ENHANCED LIPOLYSIS IN VITRO. *Diabetologia*, 1969, 5(3), 195-&.
- LIN, S., T. C. THOMAS, L. H. STORLIEN AND X. F. HUANG Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *International Journal of Obesity*, May 2000, 24(5), 639-646.
- LIVAK, K. J. AND T. D. SCHMITTGEN Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, Dec 2001, 25(4), 402-408.
- MACDOUGALD, O. A., C. S. HWANG, H. Y. FAN AND M. D. LANE REGULATED EXPRESSION OF THE OBESE GENE-PRODUCT (LEPTIN) IN WHITE ADIPOSE-TISSUE AND 3T3-L1 ADIPOCYTES. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Sep 1995, 92(20), 9034-9037.
- MACHINAL-QUELIN, F., M. N. DIEUDONNE, M. C. LENEVEU, R. PECQUERY, et al. Preadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, Apr 2002, 282(4), C853-C863.
- MACKNESS, M. I., C. ABBOTT, S. ARROL AND P. N. DURRINGTON THE ROLE OF HIGH-DENSITY-LIPOPROTEIN AND LIPID-SOLUBLE ANTIOXIDANT VITAMINS IN INHIBITING LOW-DENSITY-LIPOPROTEIN OXIDATION. *Biochemical Journal*, Sep 1993, 294, 829-834.
- MAEDA, N., M. TAKAHASHI, T. FUNAHASHI, S. KIHARA, et al. PPAR gamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*, Sep 2001, 50(9), 2094-2099.
- MASUZAKI, H., Y. OGAWA, N. SAGAWA, K. HOSODA, et al. Nonadipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Medicine*, Sep 1997, 3(9), 1029-1033.
- MEDRIKOVA, D., Z. M. JILKOVA, K. BARDOVA, P. JANOVSKA, et al. Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: adipose tissue expandability and glycemic control. *International Journal of Obesity*, Feb 2012, 36(2), 262-272.
- MIYOSHI, H., S. C. SOUZA, H. H. ZHANG, K. J. STRISSEL, et al. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, Jun 2006, 281(23), 15837-15844.
- MOINAT, M., C. J. DENG, P. MUZZIN, F. ASSIMACOPOULOSJEANNET, et al. MODULATION OF OBESE GENE-EXPRESSION IN RAT BROWN AND WHITE ADIPOSE TISSUES. *Febs Letters*, Oct 1995, 373(2), 131-134.
- MORRISON, S. F., K. NAKAMURA AND C. J. MADDEN Central control of thermogenesis in mammals. *Experimental Physiology*, Jul 2008, 93(7), 773-797.
- MORRISON, S. R. Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis. *News in Physiological Sciences*, Apr 2004, 19, 67-74.
- MULLER, G., J. ERTL, M. GERL AND G. PREIBISCH Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, Apr 1997, 272(16), 10585-10593.

- MUNZBERG, H., J. S. FLIER AND C. BJORBAEK Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology*, Nov 2004, 145(11), 4880-4889.
- NISHINA, P. M., S. LOWE, J. L. WANG AND B. PAIGEN CHARACTERIZATION OF PLASMA-LIPIDS IN GENETICALLY-OBESE MICE - THE MUTANTS OBESE, DIABETES, FAT, TUBBY, AND LETHAL YELLOW. *Metabolism-Clinical and Experimental*, May 1994, 43(5), 549-553.
- NOWAK, K. W., P. MACKOWIAK, L. NOGOWSKI, T. SZKUDELSKI, et al. Acute leptin action on insulin blood level and liver insulin receptor in the rat. *Life Sciences*, Sep 1998, 63(15), 1347-1352.
- OLIVER, P., C. PICO AND A. PALOU Ontogenesis of leptin expression in different adipose tissue depots in the rat. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, Jun 2001, 442(3), 383-390.
- ONO-MOORE, K. D., M. FERGUSON, M. L. BLACKBURN, H. ISSAFRAS, et al. Application of an In Vivo Hepatic Triacylglycerol Production Method in the Setting of a High-Fat Diet in Mice. *Nutrients*, Jan 2017, 9(1), 15.
- OUCHI, N., S. KIHARA, Y. ARITA, Y. OKAMOTO, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappa B signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*, Sep 2000, 102(11), 1296-1301.
- PATEL, L., A. C. BUCKELS, I. J. KINGHORN, P. R. MURDOCK, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Jan 2003, 300(2), 472-476.
- PETROVIC, N., T. B. WALDEN, I. G. SHABALINA, J. A. TIMMONS, et al. Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma (PPAR gamma) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, Mar 2010, 285(10), 7153-7164.
- PRPIC, V., P. M. WATSON, I. C. FRAMPTON, M. A. SABOL, et al. Differential mechanisms and development of leptin resistance in A/J versus C57BL/6J mice during diet-induced obesity. *Endocrinology*, Apr 2003, 144(4), 1155-1163.
- PUIGSERVER, P., Z. D. WU, C. W. PARK, R. GRAVES, et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, Mar 1998, 92(6), 829-839.
- PURDHAM, D. M., M. X. ZOU, V. RAJAPUROHITAM AND M. KARMAZYN Rat heart is a site of leptin production and action. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, Dec 2004, 287(6), H2877-H2884.
- RAYNER, D. V. AND P. TRAYHURN Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, 2001, 79(1), 8-20.
- ROSEN, E. D. AND O. A. MACDOUGALD Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Dec 2006, 7(12), 885-896.
- ROSEN, E. D., P. SARRAF, A. E. TROY, G. BRADWIN, et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular Cell*, Oct 1999, 4(4), 611-617.
- ROSENWALD, M., A. PERDIKARI, T. RULICKE AND C. WOLFRUM Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature Cell Biology*, Jun 2013, 15(6), 659-+.

- ROSSMEISL, M., Z. M. JILKOVA, O. KUDA, T. JELENIK, et al. Metabolic Effects of n-3 PUFA as Phospholipids Are Superior to Triglycerides in Mice Fed a High-Fat Diet: Possible Role of Endocannabinoids. *Plos One*, Jun 2012, 7(6), 13.
- SAAD, M. F., S. DAMANI, R. L. GINGERICH, M. G. RIADGABRIEL, et al. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Feb 1997, 82(2), 579-584.
- SANCHEZ-GURMACHES, J. AND D. A. GUERTIN Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, Mar 2014, 1842(3), 340-351.
- SANOSSIAN, N., J. L. SAVER, M. NAVAB AND B. OVBIAGELE High-density lipoprotein cholesterol - An emerging target for stroke treatment. *Stroke*, Mar 2007, 38(3), 1104-1109.
- SAVAGE, D. B., C. P. SEWTER, E. S. KLENK, D. G. SEGAL, et al. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*, Oct 2001, 50(10), 2199-2202.
- SCHAFFER, J. E. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current Opinion in Lipidology*, Jun 2003, 14(3), 281-287.
- SCHERER, P. E., S. WILLIAMS, M. FOGLIANO, G. BALDINI, et al. A NOVEL SERUM-PROTEIN SIMILAR TO C1Q, PRODUCED EXCLUSIVELY IN ADIPOCYTES. *Journal of Biological Chemistry*, Nov 1995, 270(45), 26746-26749.
- SCHWABE, R. F. AND D. A. BRENNER Mechanisms of liver injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, Apr 2006, 290(4), G583-G589.
- SEALE, P., B. BJORK, W. L. YANG, S. KAJIMURA, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, Aug 2008, 454(7207), 961-U927.
- SEALE, P., H. M. CONROE, J. ESTALL, S. KAJIMURA, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *Journal of Clinical Investigation*, Jan 2011, 121(1), 96-105.
- SHARMA, V., S. MUSTAFA, N. PATEL, R. WAMBOLT, et al. Stimulation of cardiac fatty acid oxidation by leptin is mediated by a nitric oxide-p38 MAPK-dependent mechanism. *European Journal of Pharmacology*, Sep 2009, 617(1-3), 113-117.
- SHOELSON, S. E., J. LEE AND A. B. GOLDFINE Inflammation and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, Jul 2006, 116(7), 1793-1801.
- SHOJIMA, N., H. SAKODA, T. OGIHARA, M. FUJISHIRO, et al. Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes*, Jun 2002, 51(6), 1737-1744.
- SIERRA-HONIGMANN, M. R., A. K. NATH, C. MURAKAMI, G. GARCIA-CARDENA, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*, Sep 1998, 281(5383), 1683-1686.
- SILVER, D. L., X. C. JIANG AND A. R. TALL Increased high density lipoprotein (HDL), defective hepatic catabolism of ApoA-I and ApoA-II, and decreased ApoA-I mRNA in ob/ob mice - Possible role of leptin in stimulation of HDL turnover. *Journal of Biological Chemistry*, Feb 1999, 274(7), 4140-4146.
- STEEL, J. H., R. WHITE AND M. G. PARKER Role of the RIP140 corepressor in ovulation and adipose biology. *Journal of Endocrinology*, Apr 2005, 185(1), 1-9.



- STEMMER, K., P. KOTZBECK, F. ZANI, M. BAUER, et al. Thermoneutral housing is a critical factor for immune function and diet-induced obesity in C57BL/6 nude mice. *International Journal of Obesity*, May 2015, 39(5), 791-797.
- STEPHAN, C. M., S. T. BAILEY, S. BHAT, E. J. BROWN, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, Jan 2001, 409(6818), 307-312.
- STRISSEL, K. J., Z. STANCHEVA, H. MIYOSHI, J. W. PERFIELD, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*, Dec 2007, 56(12), 2910-2918.
- SUGANAMI, E., H. TAKAGI, H. OHASHI, K. SUZUMA, et al. Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization - Possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells. *Diabetes*, Sep 2004, 53(9), 2443-2448.
- SURWIT, R. S., M. N. FEINGLOS, J. RODIN, A. SUTHERLAND, et al. DIFFERENTIAL-EFFECTS OF FAT AND SUCROSE ON THE DEVELOPMENT OF OBESITY AND DIABETES IN C57BL/6J AND A/J MICE. *Metabolism-Clinical and Experimental*, May 1995, 44(5), 645-651.
- SZTALRYD, C., G. H. XU, H. DORWARD, J. T. TANSEY, et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *Journal of Cell Biology*, Jun 2003, 161(6), 1093-1103.
- TAI, E. S. AND J. M. ORDOVAS The role of perilipin in human obesity and insulin resistance. *Current Opinion in Lipidology*, Apr 2007, 18(2), 152-156.
- TANG, W., D. ZEVE, J. M. SUH, D. BOSNAKOVSKI, et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*, Oct 2008, 322(5901), 583-586.
- TEODORO, J. S., P. ZOUHAR, P. FLACHS, K. BARDOVA, et al. Enhancement of brown fat thermogenesis using chenodeoxycholic acid in mice. *International Journal of Obesity*, Aug 2014, 38(8), 1027-1034.
- TRAYHURN, P., M. E. A. THOMAS, J. S. DUNCAN AND D. V. RAYNER EFFECTS OF FASTING AND REFEEDING ON OB GENE-EXPRESSION IN WHITE ADIPOSE-TISSUE OF LEAN AND OBESE (OBLOB) MICE. *Febs Letters*, Jul 1995, 368(3), 488-490.
- UMEK, R. M., A. D. FRIEDMAN AND S. L. MCKNIGHT CCAAT-ENHANCER BINDING-PROTEIN - A COMPONENT OF A DIFFERENTIATION SWITCH. *Science*, Jan 1991, 251(4991), 288-292.
- VAZQUEZ-VELA, M. E. F., N. TORRES AND A. R. TOVAR White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research*, Nov 2008, 39(8), 715-728.
- VEGIOPOULOS, A., K. MULLER-DECKER, D. STRZODA, I. SCHMITT, et al. Cyclooxygenase-2 Controls Energy Homeostasis in Mice by de Novo Recruitment of Brown Adipocytes. *Science*, May 2010, 328(5982), 1158-1161.
- VILLENA, J. A., S. ROY, E. SARKADI-NAGY, K. H. KIM, et al. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids. *Journal of Biological Chemistry*, Nov 2004, 279(45), 47066-47075.
- WAGONER, B., D. B. HAUSMAN AND R. B. S. HARRIS Direct and indirect effects of leptin on preadipocyte proliferation and differentiation. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, Jun 2006, 290(6), R1557-R1564.
- WALDER, K., A. FILIPPIS, S. CLARK, P. ZIMMET, et al. Leptin inhibits insulin binding in isolated rat adipocytes. *Journal of Endocrinology*, Dec 1997, 155(3), R5-R7.
- WANG, Q. A., C. TAO, R. K. GUPTA AND P. E. SCHERER Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine*, Oct 2013, 19(10), 1338-+.

- WANG, Y. X., S. SULLIVAN, M. TRUJILLO, M. J. LEE, et al. Perilipin expression in human adipose tissues: Effects of severe obesity, gender, and depot. *Obesity Research*, Aug 2003, 11(8), 930-936.
- WEISBERG, S. P., D. MCCANN, M. DESAI, M. ROSENBAUM, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, Dec 2003, 112(12), 1796-1808.
- WILLIAMS, L. M., F. M. CAMPBELL, J. E. DREW, C. KOCH, et al. The Development of Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance in C57Bl/6 Mice on a High-Fat Diet Consists of Distinct Phases. *Plos One*, Aug 2014, 9(8), 19.
- WU, J., P. BOSTROM, L. M. SPARKS, L. YE, et al. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell*, Jul 2012, 150(2), 366-376.
- XUE, B. Z., J. S. RIM, J. C. HOGAN, A. A. COULTER, et al. Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *Journal of Lipid Research*, Jan 2007, 48(1), 41-51.
- YAMAUCHI, T., J. KAMON, Y. MINOKOSHI, Y. ITO, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*, Nov 2002, 8(11), 1288-1295.
- YAMAUCHI, T., J. KAMON, H. WAKI, Y. TERAUCHI, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature Medicine*, Aug 2001, 7(8), 941-946.
- YOUNG, P., J. R. S. ARCH AND M. ASHWELL BROWN ADIPOSE-TISSUE IN THE PARAMETRIAL FAT PAD OF THE MOUSE. *Febs Letters*, 1984, 167(1), 10-14.
- YURA, S., H. ITOH, N. SAGAWA, H. YAMAMOTO, et al. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metabolism*, Jun 2005, 1(6), 371-378.
- ZHANG, H. H., S. C. SOUZA, K. V. MULIRO, F. B. KRAEMER, et al. Lipase-selective functional domains of perilipin A differentially regulate constitutive and protein kinase A-stimulated lipolysis. *Journal of Biological Chemistry*, Dec 2003, 278(51), 51535-51542.
- ZHANG, Y. Y., K. Y. GUO, P. A. DIAZ, M. HEO, et al. Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, Jan 2002, 282(1), R226-R234.
- ZHU, M., J. MIURA, L. X. LU, M. BERNIER, et al. Circulating adiponectin levels increase in rats on caloric restriction: the potential for insulin sensitization. *Experimental Gerontology*, Jul 2004, 39(7), 1049-1059.
- ZIEGLER, U. AND P. GROSCURTH Morphological features of cell death. *News in Physiological Sciences*, Jun 2004, 19, 124-128.
- ZIMMERMANN, R., J. G. STRAUSS, G. HAEMMERLE, G. SCHOISWOHL, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, Nov 2004, 306(5700), 1383-1386.

### **Učebnice:**

- GANONG, W. F. *Přehled lékařské fyziologie*. Jinočany, H&H, 1999
- SVAČINA, Š., et al. *Klinická dietologie*. Praha, Grada, 2008
- VOET, D. AND J.G. VOETOVÁ *Biochemie*. Praha, Victoria Publishing, 1994